



Enriquiment d'una població d'arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics en un reactor UASB

Treball de Final de Grau

Dirigit per

Dr. August Bonmatí i Míriam Cerrillo

Lluís Morey Gual

Castelldefels, Gener 2015

Agraïments

Abans de començar voldria donar les gràcies a totes aquelles persones que han influït per fer possible la realització d'aquest treball.

En primer lloc, a *Xavier Flotats* per ser un gran professor i una gran persona que ha aconseguit cautivar-me amb el món de l'enginyeria ambiental, i per fer possible la realització d'aquest treball en el GIRO.

A tota la gent del GIRO, que m'han ajudat en tot moment i han fet de la meva estada un període per recordar. Especialment a *August Bonmatí* per dirigir el meu projecte i aconsellar-me en tot moment, i a *Miriam Cerrillo* per ser una gran companya i una gran professional, per l'ajuda que m'ha proporcionat i els bons moments de treball entre esquitxades de purí i obturacions de les bombes d'alimentació.

Als companys de classe, *Laura, Javier, Neus* i *Gerard*. Per tots els bons moments que hem passat fent treballs, estudiant al bar amb "criossants" de xocolata i sopars de "conill amb ceba". En definitiva, per fer de la universitat un lloc millor.

Finalment, però no menys important, a la meva família, sobretot *Pere* i *Pilar*, per impulsar-me a estudiar i ampliar els meus coneixements, i per tots els consells i suport que m'han donat durant tota la meva vida.

Resum

La digestió anaeròbia és una tecnologia àmpliament coneguda pel tractament de residus orgànics. Mitjançant aquest procés la matèria orgànica es mineralitza parcialment i s'obté un gas combustible, biogàs, amb un contingut elevat de metà. Existeixen diversos tipus de reactors, entre aquests els reactors amb retenció de biomassa són els més adequats quan el substrat a tractar no té sòlids particulats i una DQO relativament baixa. El reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) és un dels reactors amb retenció de biomassa més àmpliament emprats. Aquests tipus de reactors fan possible una gran disminució del temps de retenció hidràulic ja que mantenen la biomassa microbiana dins el reactor augmentant la seva concentració i allargant el temps de retenció cel·lular.

L'objectiu del present treball ha estat enriquir biomassa granular adaptada a alta càrrega orgànica, per ser usada a posteriori en un sistema bioelectroquímic per produir metà a partir de CO₂.

S'ha utilitzat una alimentació sintètica amb àcid acètic per activar els grànuls i adaptar-los a velocitats de càrrega orgànica elevades (10 kg DQO/m³·dia) i finalment s'ha substituït l'àcid acètic de l'influent per metanol per enriquir els grànuls amb arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics. Paral·lelament s'han realitzat assajos d'activitat metanogènica de l'inòcul inicial i de la biomassa granular del reactor als 215 dies d'operació, abans de la substitució d'àcid acètic per metanol, per avaluar l'activació dels grànuls.

Durant tota la operació del reactor, la degradació de DQO ha estat elevada (70-95%) i no s'ha observat cap fenomen de sobrecàrrega orgànica, indicant que la operació del reactor ha estat adequada i que la biomassa s'ha adaptat a les altes velocitats de càrrega orgànica. Dels assajos d'activitat es pot concloure que l'inòcul inicial, malgrat el llarg període de conservació en refrigeració, presenta una bona activitat metanogènica i que aquesta només millora lleugerament després de l'operació del reactor UASB alimentat amb solució sintètica amb àcid acètic assolint valors de 212,9 mgDQO/gSSV·d, comparables als obtinguts per diferents autors.

Tot i la finalització d'aquest treball encara continua el procés d'enriquiment amb metanol.

Com a continuació del present estudi s'estudiarà la composició de les poblacions de microorganismes mitjançant tècniques de biologia molecular, per la qual cosa s'ha pres mostra de l'inòcul inicial, de l'inòcul a 215 dies d'operació i s'agafarà mostra quan acabi el període d'alimentació amb metanol.

Hom espera que aquest estudi contribueixi a la millora del coneixement i operació de reactors anaerobis.

Paraules clau: UASB, Metanogènesi, Metà, Digestió anaeròbia, Arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics, Àcid acètic, Metanol.

Resumen

La digestión anaerobia es una tecnología ampliamente conocida para el tratamiento de residuos orgánicos. Mediante este proceso la materia orgánica se mineraliza parcialmente y se obtiene un gas combustible, biogás, con un contenido elevado de metano. Existen diversos tipos de reactores, entre ellos los reactores con retención de biomasa son los más adecuados cuando el sustrato a tratar no tiene sólidos particulados y una DQO relativamente baja. El reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) es uno de los reactores con retención de biomasa más ampliamente utilizados. Estos reactores hacen posible una gran disminución del tiempo de retención hidráulico ya que mantienen la biomasa microbiana dentro del reactor aumentando su concentración y alargando el tiempo de retención celular.

El objetivo del presente trabajo ha sido enriquecer biomasa granular hidrogenotrófica adaptada a alta carga orgánica, para ser usada a posteriori en un sistema bioelectroquímico para producir metano a partir de CO₂.

Se ha utilizado una alimentación sintética con ácido acético para activar los gránulos y adaptarlos a grandes velocidades de carga orgánica (10 kg DQO/m³·d) y finalmente se ha sustituido el ácido acético del influente por metanol para enriquecer los gránulos con arqueobacterias metanogénicas hidrogenotróficas. Paralelamente se han realizado ensayos de actividad metanogénica del inóculo inicial i de la biomassa granular del reactor a los 215 días de operación, antes de la substitución del ácido acético a metanol, para evaluar la activación de los gránulos.

Durante toda la operación del reactor, la degradación de DQO ha sido elevada (70-95%) y no se ha observado ningún fenómeno de sobrecarga orgánica, indicando que la operación del reactor ha sido adecuada i que la biomasa se ha adaptado a altas velocidades de carga orgánica. De los ensayos de actividad se puede concluir que el inóculo inicial, a pesar del largo período de conservación en refrigeración, presenta una buena actividad metanogénica y que esta sólo mejora ligeramente después de la operación del reactor UASB alimentado con una solución sintética con ácido acético consiguiendo valores de 212,9 mgDQO/gSSV·d, comparables a los obtenidos por diferentes autores.

Aunque se ha finalizado el trabajo, aún continua el proceso de enriquecimiento con metanol. Como continuación del presente estudio se estudiará la composición de las poblaciones de microorganismos mediante técnicas de biología molecular, por lo cual se ha tomado muestra del inóculo inicial, del inóculo a 215 de operación y se tomará muestra cuando acabe el periodo de alimentación con metanol.

Se espera que este estudio contribuya a la mejora del conocimiento y operación de reactores anaeróbios.

Palabras clave: UASB, Metanogénesis, Metano, Digestión anaerobia, Arqueobacterias metanogénicas hidrogenotróficas, Acido acético, Metanol.

Abstract

Anaerobic digestion is a technology widely known for the treatment of organic wastes. By this process the organic matter is partially mineralized and a fuel gas, biogas, is obtained, with a high methane content. Various types of reactors, including reactors with biomass retention are most suitable when the substrate to be treated particulate solids and has a relatively low COD. The UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) is one of the reactors with retention of biomass most widely used. These reactors make possible a decrease of hydraulic retention time as they maintain the microbial biomass in the reactor increasing its concentration and prolonging cell retention time.

In this study, an UASB reactor has been used to enrich significant amounts of granular hydrogenotrophic biomass adapted to high concentrations of organic load, to produce methane from CO₂ with electrochemically assisted system.

We used a synthetic feed with acetic acid to activate the granules and adapt them to high organic loading rates (10 kg COD/m³·day) and finally acetic acid has been replaced by methanol influent to enrich granules with methanogenic hydrogenotrophic archaea. Parallel methanogenic activity assays were performed of the initial inoculum and the granular sludge of reactor at 215 operating days, before the replacement of acetic acid by methanol to evaluate the activation of the granules.

Throughout the operation of the reactor, COD degradation was high (70-95%) and shows no organic overload phenomenon, indicating that operation of the reactor has been adequate and the biomass is adapted to high organic loading rates. Activity assays of it can be concluded that the initial inoculum, despite the long refrigerated period, has a good methanogenic activity and this only improve slightly after the operation of the UASB reactor fed with synthetic solution containing acetic acid, obtaining 212,9 mgDQO/gSSV-d, a value comparable with reviews.

Despite the work has been finished, the enrichment process with methanol is still ongoing. As a continuation of this study, composition of microorganism population will be studied by molecular biology. Therefore, samples of initial inoculum and 215 operation days inoculum were taken, and a sample will be taken when methanol feeding finished.

It is hoped that this study will contribute to the improvement of knowledge and operation of anaerobic reactors.

Key words: UASB, Methanogenesis, Methane, Anaerobic digestion, Methanogenic hydrogenotrophic archaea, Acetic acid, Methanol.

Índex

1. ANTECEDENTS I OBJECTIUS	8
1.1 CONTEXT	8
1.2 ESTAT ACTUAL DE LA PRODUCCIÓ DE BIOGÀS A EUROPA	8
1.3 OBJECTIUS	10
1.4 CONTEXTUALITZACIÓ DEL TREBALL	10
2. INTRODUCCIÓ	12
2.1. DIGESTIÓ ANAERÒBIA	12
2.2. ETAPES DE LA DIGESTIÓ ANAERÒBIA:	12
2.2.1 HIDRÒLISI:	14
2.2.2 ACIDOGÈNESI:	14
2.2.3 ACETOGÈNESI:	14
2.2.4 METANOGÈNESI:	15
2.3 UPFLOW ANAEROBIC SLUDGE BLANKET (UASB):	18
2.3.1 PARÀMETRES OPERACIONALS:	20
2.3.2 PROCÉS DE GRANULACIÓ	23
2.3.3 AVANTATGES DELS GRÀNULS:	25
2.3.4 COMPOSICIÓ DELS GRÀNULS:	25
2.3.5 FACTORS QUE AFECTEN A LA GRANULACIÓ:	27
2.4 PROCESSOS COMBINATS: DIGESTIÓ ANAERÒBIA + BES (SISTEMES BIOELECTROQUÍMICS)	28
2.4.1 CÈL·LULA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (MFC)	29
2.4.2 CÈL·LULA D'ELECTRÒLISI MICROBIANA (MEC)	30
2.4.3 GENERACIÓ DE METÀ EN SISTEMES BIOELECTROQUÍMICS	31
3. MATERIALS I MÈTODES	34
3.1. REACTOR UASB	34
FIGURA 3.2 ESQUEMA DEL MUNTATGE EXPERIMENTAL DEL REACTOR UASB.	35
3.2. OPERACIÓ DEL REACTOR	36
3.3. ASSAJOS D'ACTIVITAT METANOGÈNICA	38
3.4. MÈTODES ANALÍTICS	41
3.4.1 PH	41
3.4.2 SÒLIDS SUSPESOS TOTALS (SST) I SÒLIDS SUSPESOS VOLÀTILS (SSV)	42
3.4.3 DEMANDA QUÍMICA D'OXÍGEN (DQO)	42
3.4.4 COMPOSICIÓ DEL BIOGÀS	43
3.4.5 ÀCIDS GRASSOS VOLÀTILS (AGV)	44

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	46
<hr/>	
4.1 EVOLUCIÓ DE LA VELOCITAT DE CÀRREGA ORGÀNICA	46
4.2 EVOLUCIÓ DE L'ELIMINACIÓ DE LA DEMANDA QUÍMICA D'OXIGEN	48
4.3 EVOLUCIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS VOLÀTILS	49
4.4 EVOLUCIÓ EN LA COMPOSICIÓ I PRODUCCIÓ DEL BIOGÀS	51
4.5 EVOLUCIÓ DEL PH DE L'EFLUENT	52
4.6 ASSAJOS D'ACTIVITAT	53
5. CONCLUSIONS	56
<hr/>	
6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	57

1. Antecedents i objectius

1.1 Context

A començament d'aquest segle el món es troba immers en una crisi en termes energètics, de qualitat d'aigua i escalfament global, a causa del continu creixement de la població, la industrialització, les pràctiques de producció d'aliments i les males estratègies d'ús de l'aigua (Latif *et al.*, 2011). Un dels problemes més importants fa referència a l'ús dels combustibles fòssils, una font limitada d'energia no renovable que és un dels grans responsables del canvi climàtic. S'observa que a nivell mundial la demanda d'energia, coberta per combustibles fòssils, actualment situada en un 88%, està creixent notablement (Weiland, 2010) i les previsions de cara al final del segle apunten que aquesta demanda augmentarà en un factor de 2 o 3 (IEA, 2006), posant en perill cada cop més el medi ambient i aproximant-nos a un exhauriment d'aquests recursos.

En aquest context les energies renovables apareixen com una solució atractiva, ja que permeten la disminució de l'efecte hivernacle mitjançant fonts de recursos inexhauribles, generant uns residus secundaris mínims. Al 2004 el consum mundial d'energia procedent de fonts d'energies renovables era d'un 15%, incloent l'energia procedent de la biomassa, l'energia hidràulica, geotèrmica, solar, eòlica i les energies marines (Affes, 2013).

La digestió anaeròbia pot tenir un paper rellevant, ja que la generació de biogàs, un gas combustible que es pot utilitzar tant per producció d'energia elèctrica i calorífica com per combustible en vehicles, redueix impactes ambientals com la pluja àcida i l'escalfament global (Demirel i Scherer, 2008; Weiland, 2010), alhora que permet la valorització de residus. Aquest procés consisteix en la degradació i estabilització d'un material orgànic, per part de microorganismes anaerobis, que porta a la formació de biogàs i productes inorgànics (Kelleher, 2002).

El biogàs està format principalment per metà (CH_4) i diòxid de carboni (CO_2) en una proporció habitual del 65% CH_4 - 35% CO_2 , la seva valorització és energèticament eficient i respectuosa amb el medi ambient a causa de les baixes emissions de contaminants generades (Appels *et al.*, 2011). Quan s'usa per a la generació d'energia, es poden arribar a produir entre 20-300 kW/h d'energia neta per tona de residu (Kwietniewska i Tys, 2014). Segons Tilche i Galatola (2008), el biogàs té el potencial de suplir el 50% de l'objectiu europeu (Directiva 2003/30/EC) pels biocarburants del 2010.

1.2 Estat actual de la producció de biogàs a Europa

La producció de biogàs en el sector agrícola és un mercat en creixement a Europa i comença a ser interessant a molts llocs del món. En les pròximes dècades la bioenergia veurà incrementat el seu pes, ja que ofereix una atractiva alternativa econòmica als combustibles fòssil (Weiland, 2010).

L'èxit de la producció del biogàs vindrà de l'oferta a baix cost i l'àmplia varietat de formes d'ús per a la producció de calor, vapor, electricitat i hidrogen i per a la utilització com a combustible per a vehicles.

La producció de biogàs a qualsevol lloc del món és possible gràcies a la gran varietat de fonts com cultius, femtes, fruites, restes vegetals o algues. A més, el procés pot esdevenir tant a petita com a gran escala (Weiland, 2010).

A la Taula 1.1., es pot veure que Alemanya és el país amb més producció d'energia procedent del biogàs, amb un total de 16205 GW/h, seguit del Regne Unit, Itàlia, França i Holanda. S'observa una tendència en l'augment de la producció i sobretot un desplaçament cap a la cogeneració de calor i electricitat, amb un augment de 7133 GW/h en cogeneració calor-electricitat en el cas d'Alemanya.

Taula 1.1. Producció bruta d'electricitat i cogeneració calor-electricitat a partir de biogàs a la Unió Europea al 2010 i 2011 (GW/h) (BiogasBarometer, 2012).

País	2010			2011		
	Producció d'electricitat	Cogeneració de calor i electricitat	Total	Producció d'electricitat	Cogeneració de calor i electricitat	Total
Alemanya	14847,0	1358,0	16205,0	10935,0	8491,0	19426,0
UK	5137,0	575,0	5712,0	5098,0	637,0	5735,0
Itàlia	1451,2	602,9	2054,1	1868,5	1536,2	3404,7
França	756,0	297,0	1053,0	780,0	337,0	1117,0
Holanda	82,0	946,0	1028,0	69,0	958,0	1027,0
Espanya	536,0	117,0	653,0	709,0	166,0	875,0
Rep.Txeca	361,0	275,0	636,0	535,0	394,0	929,0
Àustria	603,0	45,0	648,0	555,0	70,0	625,0
Bèlgica	149,0	417,0	566,0	158,0	442,0	600,0
Polònia	0,0	398,4	398,4	0,0	430,0	430,0
Dinamarca	1,0	352,0	353,0	1,0	342,0	343,0
Irlanda	184,0	22,0	206,0	181,0	22,0	203,0
Grècia	190,5	31,4	221,9	37,6	161,7	199,3
Hongria	75,0	21,0	96,0	128,0	55,0	183,0
Portugal	90,0	11,0	101,0	149,0	11,0	160,0
Eslovènia	7,2	90,2	97,4	5,7	121,0	126,7
Eslovàquia	1,0	21,0	22,0	39,0	74,0	113,0
Letònia	5,9	50,8	56,7	0,0	105,3	105,3
Finlàndia	51,5	37,8	89,3	53,6	36,4	90,0
Luxemburg	0,0	55,9	55,9	0,0	55,3	55,3
Lituània	0,0	31,0	31,0	0,0	37,0	37,0
Suècia	0,0	36,4	36,4	0,0	33,0	33,0
Romania	0,0	1,0	1,0	0,0	19,1	19,1
Estònia	0,0	10,2	10,2	0,0	17	17,0
UE	24528,2	5803,0	30331,2	21302,4	14554,1	35856,4

Una de les claus del creixement futur del sector serà la millora de l'eficiència energètica del biogàs. Fins fa poc, el creixement del sector va ser impulsat en gran part pels incentius lligats a la producció d'electricitat mentre que els usos tèrmics van ser relegats a un segon lloc. No obstant, aquest tipus de creixement es considerat insostenible a llarg termini.

Per tal d'augmentar la producció del biogàs, entre altres coses, es recorre a la codigestió. Aquesta pràctica consisteix en barrejar residus amb composicions complementàries per tal d'incrementar la producció de biogàs i així fer econòmicament viables les plantes. També permet unificar els mètodes de gestió i optimitzar els costos d'inversió (Flotats i Sarquella, 2008). Per exemple, les dejeccions ramaderes presenten un baix potencial de producció de metà i un alt contingut d'amoni, però tenen una alta capacitat tampó, mentre alguns residus orgànics industrials presenten característiques totalment oposades. Per tant, la digestió anaeròbia de mesclures d'ambdós substrats és en molts casos la manera d'aconseguir una alta producció de biogàs mantenint al mateix temps un procés estable.

Una possible tècnica alternativa per augmentar el poder calorífic del biogàs és incrementar la concentració de metà. Recentment s'ha demostrat que hi ha biomassa exoelectrogènica que pot convertir el diòxid de carboni en metà en un sistema bioelectroquímic, si s'opera el biocàtode amb un potencial reductiu adequat. Si tenim present que aproximadament una tercera part del biogàs és CO_2 , podria aprofitar-se aquest procés per tal de convertir-lo en CH_4 i millorar el potencial energètic del biogàs combinant els processos de digestió anaeròbia i els sistemes bioelectroquímics (Min i Angelidaki, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Weld i Singh, 2011).

1.3 Objectius

L'objectiu d'aquest treball és construir i operar un reactor UASB mesòfil d'escala de laboratori, adaptat a condicions d'altres velocitats de càrrega orgànica i de nitrogen.

L'objectiu final de l'operació del reactor és enriquir quantitats significatives de biomassa granular hidrogenotròfica adaptada a aquestes condicions, que serà usada a posteriori per produir metà a partir del CO_2 present en el biogàs en un sistema electroquímicament assistit.

1.4 Contextualització del treball

El treball s'ha realitzat a les instal·lacions de l'IRTA, a Torre Marimon, amb el grup de Gestió Integral de Residus Orgànics (GIRO), dins el projecte INtegración de reactores Bioelectroquímicos y digestores anaerobios para optimizar la recuperación de Energía y NiTrógeno (INBENT).

El projecte es centra especialment en el desenvolupament dels sistemes bioelectroquímics per la recuperació de nitrogen i la electrometanogènesi per enriquir el biogàs.

Les tasques realitzades en aquest treball de final de grau formen part del projecte INBENT, concretament l'activitat anomenada Disseny i control d'un reactor UASB per enriquir biomassa hidrogenotròfica susceptible d'usar-se en els sistemes bioelectroquímics per enriquir el biogàs.

2. Introducció

2.1. Digestió anaeròbia

La digestió anaeròbia és un dels processos més antics utilitzats per a l'estabilització dels residus sòlids i dels biosòlids. Consisteix en la descomposició de la matèria orgànica en absència d'oxigen (O_2). Les principals aplicacions de la digestió anaeròbia són l'estabilització dels llots concentrats procedents del tractament d'aigües residuals municipals i industrials. S'han fet grans progressos en la comprensió fonamental i el control del procés, la mida dels tancs i el disseny i aplicació de l'equip. A causa de l'èmfasi en la conservació de l'energia i la recuperació i conveniència d'un ús beneficiós dels biosòlids d'aigües residuals, la digestió anaeròbia segueix sent el procés més habitual per a l'estabilització dels fangs. D'altra banda, la digestió anaeròbia de fangs d'aigües residuals municipals pot, en molts casos, produir suficient biogàs per satisfer un percentatge elevat de les necessitats d'energia per l'operació d'una estació d'aigües residuals (Metcalf i Eddy, 2004).

Així mateix, cada cop hi ha un nombre més elevat d'aplicacions en el tractament de dejeccions ramaderes amb altres residus agroalimentaris.

2.2. Etapes de la digestió anaeròbia:

Durant la digestió anaeròbia, les molècules complexes (polisacàrids, proteïnes, lípids i lignina) es descomponen en molècules més petites fins a CH_4 i CO_2 com a productes finals. Aquest procés consta de quatre etapes: hidròlisi, acidogènesi, acetogènesi i metanogènesi (Figura 2.1), a cada una de les etapes intervenen diferents microorganismes per tal de realitzar les reaccions que ocorren durant el procés. La majoria de microorganismes oxiden determinats composts orgànics per tal d'obtenir energia per créixer. Alguns dels productes finals del metabolisme d'un grup són l'aliment del grup següent (Demirel i Scherer, 2008), per tant durant el procés s'estableix un equilibri de poblacions que s'ha de mantenir perquè totes les etapes es desenvolupin adequadament.

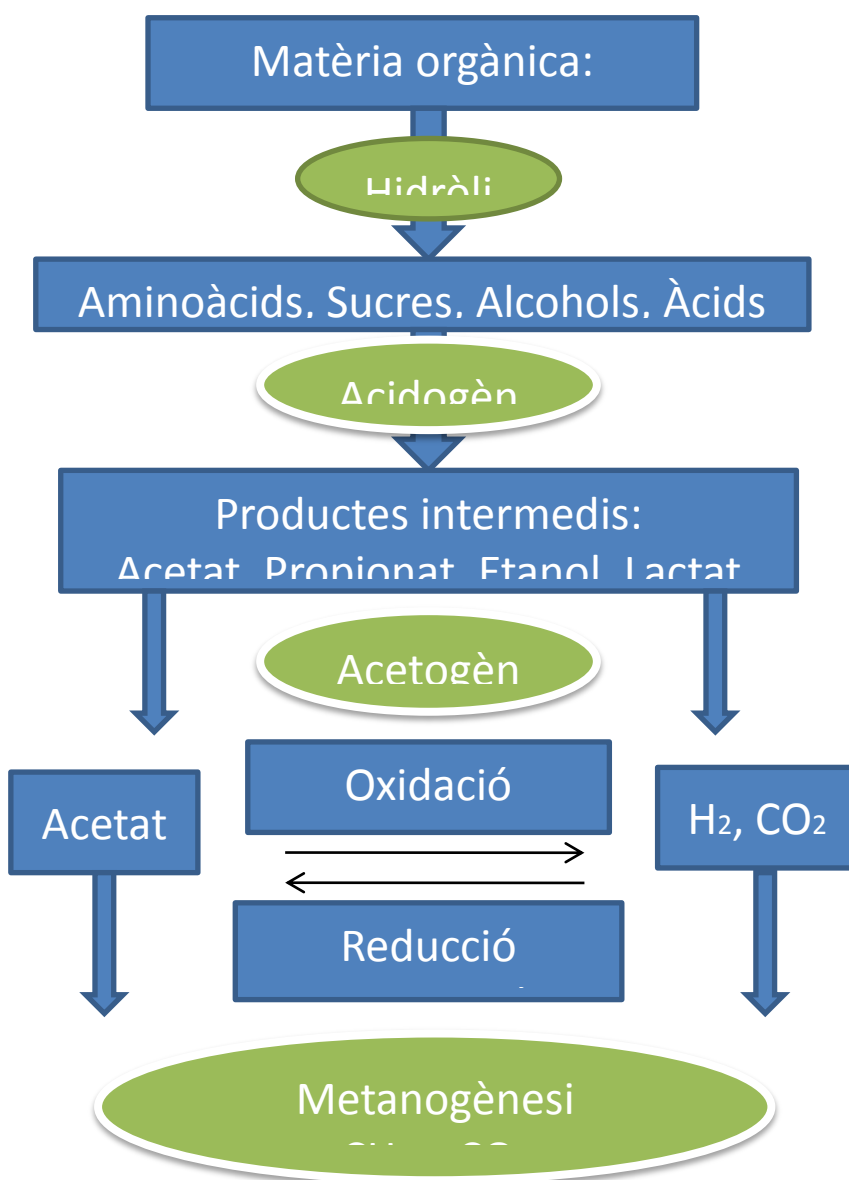


Figura 2.1. Conversió anaeròbia de la biomassa a metà. Adaptació de (Demirel i Scherer, 2008).

A l'inici del procés, la matèria orgànica particulada és hidrolitzada per bacteris fermentatius hidrolítics en els seus monòmers o dímers corresponents. Aquests són usats pels bacteris fermentatius per obtenir energia pel creixement (acidogènesi). Els productes resultants són alcohols i àcids grassos volàtils que a posteriori són oxidats per altres bacteris fermentatius a hidrogen i acetat (acetogènesi). Finalment, els arqueobacteris metanogènics transformen l'hidrogen i l'acetat a metà i diòxid de carboni (metanogènesi) (Angelidaki *et al.*, 1999; Batstone *et al.*, 2002). A continuació es descriuen amb més detall les diferents etapes.

2.2.1 Hidròlisi:

La primera etapa, la hidròlisi, la realitzen bacteris hidrolítics. Aquests transformen la matèria orgànica complexa en molècules més simples com sucres, aminoàcids, i àcids grassos. Els bacteris hidrolítics són facultatius, per tant poden consumir l'oxigen que pugui haver-hi dins el reactor ajudant a obtenir condicions anaeròbies. Depenent de l'enzim extracel·lular que catalitza la reacció (cel·lulasa, proteasa, lipasa..) poden subdividir-se en cel·lulolítics, aminolítics, proteolítics i lipolítics. *Clostridium*, *Staphylococcus* i *Bacteroides* són alguns dels gèneres més representatius dins aquest grup.

Hi ha diferents factors que poden afectar la velocitat d'hidròlisi, com el pH, la temperatura, la concentració de biomassa hidrolítica, tamany de les partícules i la composició del substrat (Lettinga *et al.*, 1996). Alguns estudis mostren un augment de la velocitat d'hidròlisi aplicant pre-tractaments per disminuir la mida de les partícules, tot i que generalment la velocitat d'hidròlisi augmenta mentre augmenta la temperatura (Bonmatí *et al.*, 2001; Pavlostathis i Giraldo-Gómez, 1991).

2.2.2 Acidogènesi:

Una vegada apareixen els productes finals de la hidròlisi comença la segona etapa, l'acidogènesi. Aquesta etapa consisteix en la ruptura per part dels bacteris acidogènics dels components romanents que encara no són susceptibles de ser usats pels metanogènics. Com a producte final del seu metabolisme alliberen hidrogen i àcids grassos, tant volàtils (àcid acètic, propiònic, n-butíric, isobutíric) com no volàtils (àcid làctic, pirúvic, succínic), així com amoni, diòxid de carboni i sulfur d'hidrogen (Powar *et al.*, 2013). En general, la població d'acidogènics representa aproximadament el 90% del total de la comunitat microbiana present en el digestor. Aquests microorganismes tenen un temps de duplicació curt i normalment l'acidogènesi es considera com la reacció més ràpida en el procés de digestió anaeròbia (Mosey, 1983). Es per això que no es considera normalment un pas limitant en el procés global de la digestió anaeròbia.

2.2.3 Acetogènesi:

En l'acetogènesi, les molècules simples formades a l'etapa anterior són metabolitzades pels bacteris acetogènics produint àcid acètic, diòxid de carboni i hidrogen (Powar *et al.*, 2013). Aquesta etapa es porta a terme pels bacteris acetogènics reductors de protons, principalment *Syntrophobacter wolinii* i *Syntrophomonas wolfei*.

Es necessària una baixa pressió parcial d'hidrogen perquè es realitzin aquestes reaccions, amb la finalitat de preservar les condicions termodinàmiques favorables per a la conversió dels àcids grassos volàtils (AGV) a acetat i H₂.

Per tal que es mantingui la condició de baixa pressió parcial d'hidrogen és necessària l'associació sintròfica amb arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics, que consumeixen hidrogen i produeixen metà. Quan no és consumit, l'etapa d'acetogènesi pot ser inhibida, causant una acumulació d'AGV, baixant el pH i, per tant, provocant la inhibició de la següent etapa, la metanogènesi (Hattori, 2008).

2.2.4 Metanogènesi:

Finalment es produeix la metanogènesi, on l'àcid acètic i l'hidrogen són la matèria primera per el creixement dels arqueobacteris metanogènics. Es tracta d'uns microorganismes anaerobis estrictes capaços de catabolitzar l'àcid acètic per un costat i el H₂ per l'altre en metà (CH₄) i diòxid de carboni (CO₂). Aquests components són els majoritaris en la composició del biogàs (Ziemiński i Frąć, 2012).

Els microorganismes que porten a terme el procés pertanyen al filum Euryarcheota. Són organismes quimiolitoheteròtrofs estrictament anaerobis que necessiten un potencial redox inferior a -300 mV, ja que concentracions d'oxigen dissolt de l'ordre de 0,01mg/L inhibeixen el seu creixement (Wolfe, 1971; Bryant, 1974). Com a font de nitrogen no usen aminoàcids ni proteïnes, usen amoníac.

Aquests microorganismes es poden classificar en dos grups, arqueobacteris hidrogenotròfics i arqueobacteris metilotròfics o acetilàstics.

Els arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics usen l'hidrogen com a donador d'electrons i HCO₃⁻ com a acceptor.



D'altra banda, les acetilàstiques formen el metà a partir de la reducció de l'acètic (CH₃COO⁻).



Els gèneres freqüentment determinats d'hidrogenotròfics són *Methanobacterium*, *Methanoculleus* i *Methanospirillum* (Hori et al., 2006). Gairebé totes es basen en la reducció de CO₂ a CH₄ i usen com a donador d'electrons H₂.

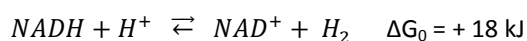
Els acetilàstics són bàsicament representats pel gènere *Methanosarcinales* i tot i que són capaços de reduir el CO₂ a CH₄, el que els caracteritza és la transformació de compostos de metil o del grup metil de l'acetat a CH₄ (Costa i Leigh, 2014). Es pensa que els acetilàstics són responsables d'un 70-80% del metà produït (Zinder et al., 1984).

La concentració d'hidrogen té un paper molt important en el procés de la digestió anaeròbia. És per això que els arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics juguen un paper transcendental, usen l'hidrogen com a donador d'electrons per a la transformació del CO_2 a CH_4 , regulant així la concentració d'hidrogen del medi.

La regulació de l'hidrogen afecta en dos punts importants del procés: l'etapa fermentativa i l'etapa acetogènica.

- Etapa fermentativa

La concentració d'hidrogen influeix en la formació de productes finals, a causa de la variació d'energia lliure de Gibbs que ocorre en la producció d'hidrogen a partir de NADH (Wolin, 1974).



Per a poder realitzar la degradació de la matèria orgànica, el NADH ha de ser oxidat a NAD^+ . Com que la reacció és termodinàmicament desfavorable, és necessària una pressió parcial d'hidrogen baixa per a que es desplaci l'equilibri cap a la formació de NAD^+ . Això ocorre quan el H_2 és consumit per altres microorganismes, com els arqueobacteris hidrogenotròfics. A més, si la pressió parcial d'hidrogen és baixa, el piruvat es degrada a acetat, diòxid de carboni i hidrogen, productes intermedis en la formació de metà. Quan la pressió parcial d'hidrogen augmenta, el flux d'electrons canvia afavorint la formació de propionat, butirat, lactat, etanol i àcids grassos de cadena llarga (Cabanès, 1989).

Per tant, un digestor amb un bon funcionament haurà de produir acetat, CO_2 i H_2 en més quantitat que propionat i butirat, i pràcticament absència de lactat i etanol indicant així que hi ha suficients microorganismes metanogènics per aconseguir una pressió parcial d'hidrogen baixa.

- Etapa acetogènica

Com s'ha comentat anteriorment, els bacteris acetogènics han d'estar associats sintròficament a espècies que consumeixin hidrogen, ja que en presència d' H_2 la formació d'acetat a partir dels àcids grassos de cadena llarga no és possible. En la Figura 2.2. s'observen les variacions d'energia lliure de Gibbs en de la formació de propionat, butirat, etanol i metà en funció de la pressió parcial d'hidrogen. Perquè les reaccions esdevinguin favorables ($\Delta G < 0$) la pressió parcial d'hidrogen ha de ser molt baixa. Així, quan la p_{H_2} és inferior a 0,15 atmosferes, la degradació d'etanol és energèticament favorable. La degradació de butirat i propionat necessita una pressió inferior a $2 \cdot 10^{-3}$ i $9 \cdot 10^{-5}$ atmosferes respectivament.

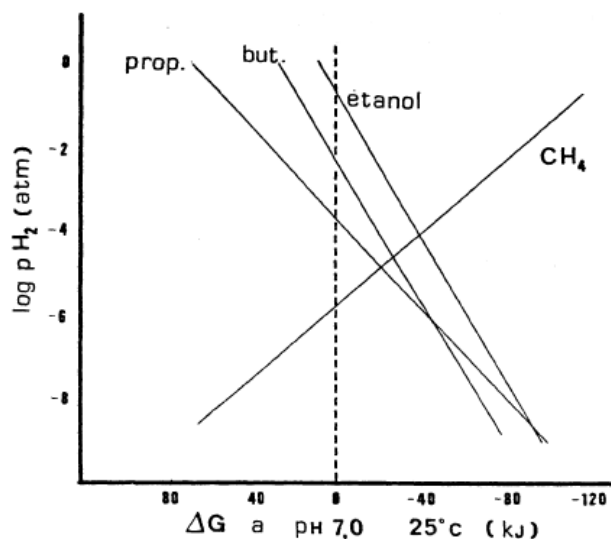


Figura 2.2. Influència de la pressió parcial d'hidrogen (p_{H_2}) sobre la variació d'energia lliure de Gibbs en la degradació d'etanol, propionat, butirat i la formació de metà (Cabanès, 1989).

El propionat és el primer àcid que s'acumula en un digestor, a causa de la necessitat d'una molt baixa pressió parcial d'hidrogen per a la seva degradació (McCarty, 1963; McCarty, 1964).

2.3 Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB):

Per el procés de digestió anaeròbia es poden usar diferents tipus de reactors en funció de les característiques de l'influent a tractar.

Si l'influent presenta gran quantitat de sòlids o una concentració molt elevada de matèria orgànica dissolta, com dejeccions ramaderes o aigües residuals industrials, s'utilitzen reactors de mescla completa o flux pistó. Tot i que tenen un bon rendiment en aquestes condicions, el fet que presentin un temps de retenció de sòlids igual que el temps de retenció hidràulic, limita la seva aplicabilitat ja que es perd la biomassa en l'efluent.

Alternativament, pel tractament d'aigües residuals amb poc contingut de sòlids, s'utilitzen reactors que són capaços de diferenciar el temps de retenció hidràulic del cel·lular. Entre aquests, cal destacar el reactor anaerobi de flux ascendent o UASB (Figura 2.3).

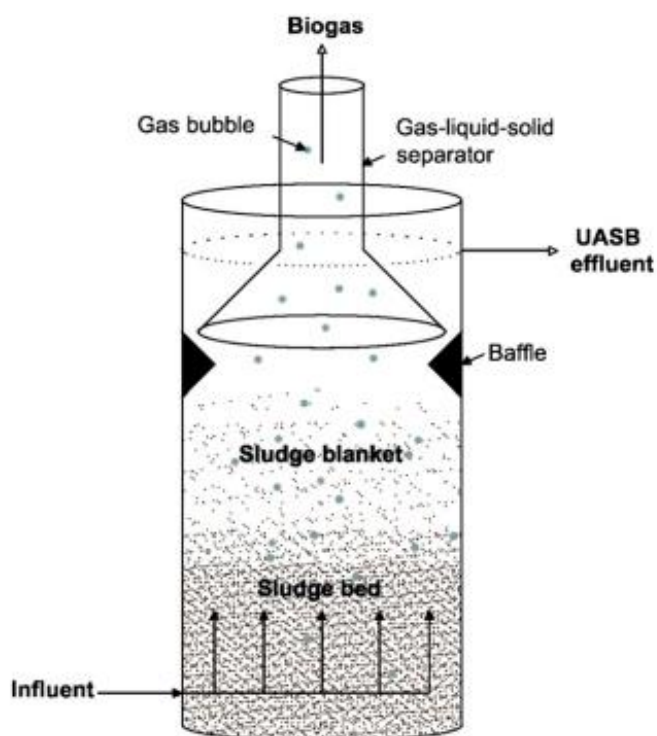


Figura 2.3. Principals components d'un reactor UASB (Chong, 2012).

La retenció dels microorganismes dins del reactor és una de les estratègies que s'apliquen per incrementar l'estabilitat i millorar el funcionament dels reactors anaerobis. Una tecnologia capaç d'aconseguir aquest objectiu és el reactor UASB, desenvolupat pel Dr. Gatzke Lettinga (Lettinga et al., 1980), el qual reté la biomassa en forma de grànuls. És per això que sovint s'utilitza en el tractament de diversos tipus d'aigües residuals tant de baixa com alta càrrega contaminant (Guardia, 2012). Com s'ha vist en la figura anterior, el reactor UASB té dos elements clau: l'alimentació al fons del reactor de manera que la corrent es distribueixi homogèniament i es generi un flux ascendent, i el separador trifàsic gas/líquid/sòlid (GLS), per separar el biogàs format, el líquid i la biomassa (grànuls).

Per arrancar un reactor UASB, el millor és inocular el reactor amb biomassa granular anaeròbia. Si no es disposa d'aquesta també es pot inocular amb biomassa floculant. L'influent flueix ascendentment i passa a través del llit o mantell de fangs. En el llit de fangs és on succeeixen les reaccions biològiques. A mesura que el flux avança, la matèria orgànica dissolta és convertida en biogàs, que tendeix a pujar, aconseguint així una barreja apropiada de fang i aigua i d'aquesta manera s'evita la necessitat d'un agitador mecànic (Kleerebezem i Macarie, 2003; Kalyuzhnyi, 1997). El biogàs produït i el fang impulsat per les bombolles de gas són posteriorment separats de l'efluent pel separador GLS, on els bafles eviten de la manera més eficient possible el rentat de grànuls amb bacteris. (Chong et al., 2012).

Sota condicions apropiades, les partícules lleugeres i disperses seran rentades mentre que els components més pesats quedaran retinguts, constituint grànuls o flocs formats per matèria orgànica, inorgànica i petits agregats de bacteris.

Després d'un cert període de temps (2-8 mesos usualment), depenent de les condicions d'operació i de les característiques de l'influent (aigua residual o inòcul de fang), es desenvolupa un llit de fangs molt dens que pot ésser granular o floculant. A sobre del llit de fangs, hi ha una zona anomenada mantell de fangs amb un creixement més difós i velocitats d'establiment de partícules més baixes. La sortida de l'efluent ocorre al capdamunt del mantell, considerat una zona de recés, on moltes de les partícules en suspensió retornen al llit de fangs. D'aquesta manera la biomassa activa es manté dins del reactor per més temps, obtenint alts valors de temps de retenció de sòlids (TRS) diferent del temps de retenció hidràulic (TRH) sense necessitat de material de suport o biofilms (Seghezzo *et al.*, 1998).

A la Taula 2.1 es presenten els beneficis i limitacions més destacats del reactor UASB.

Taula 2.1. Principals beneficis i limitacions del UASB. Adaptat de (Lettinga *et al.*, 1980; Chong *et al.*, 2012).

Beneficis	Limitacions
Disponibilitat de grànuls o flòculs de fang sense requeriment d'un medi de suport.	La posta en marxa és susceptible a la temperatura i als xocs de càrrega orgànica.
Alt contingut de biomassa, permetent un ample rang de càrregues i una alta eficiència d'eliminació de DQO.	Dificultats per controlar les expansions del llit, que limita els rangs d'aplicació de càrregues orgàniques.
La zona de "blanket sludge" o mantell permet un curt TRH i un llarg TRS.	Rentat, flotació i desintegració dels grànuls de fang.
La producció de bombolles de gas ascendent eliminen la necessitat de mescla reduint així la demanda d'energia.	Altes concentracions de sulfats.
Baixa producció de residus sòlids biològics.	Necessitat d'un post-tractament per la descàrrega de matèria orgànica, nutrients i patògens.
El fang biològic residual és un producte molt estabilitzat.	Purificació del biogàs.
Fang anaeròbic actiu pot ésser preservat sense alimentació durant varis mesos.	Períodes relativament llargs per posar en funcionament el procés, a causa del baix creixement de les bacteris anaeròbis.
Baixos requeriments de nutrients.	
Producció de metà, un producte útil.	

2.3.1 Paràmetres operacionals:

Les consideracions i paràmetres més importants a l'hora de dissenyar un reactor UASB són: composició i contingut de sòlids de l'influent (normalment aigües residuals), velocitat de càrrega orgànica, velocitat de flux ascendent, volum del reactor, característiques físiques, incloent el sistema de distribució de l'influent i el sistema de recollida de gas (Lettinga i Hulshoff Pol 1991).

A continuació es descriuen amb més detall aquests aspectes:

- Característiques de les aigües residuals:

Les aigües residuals que presenten un nivell elevat de greixos i/o proteïnes poden afectar negativament la granulació de fangs o causar formació d'escuma, per això es consideren limitants important d'aquests sistemes.

La fracció de partícules en front de la DQO soluble és important en la determinació de les càrregues admissibles per a reactors UASB. A mesura que la fracció de sòlids augmenta, la capacitat de formar uns grànuls densos disminueix (Metcalf i Eddy, 2004).

- Velocitat de càrrega orgànica:

La velocitat de càrrega orgànica és la quantitat de matèria orgànica introduïda per unitat de temps i volum de reactor. Quan es produeix una eliminació de més del 90% de DQO i les concentracions de sòlids de l'efluent són acceptables, es considera que pot augmentar-se la càrrega. Això afavoreix la formació de grànuls més densos (Metcalf i Eddy, 2004).

$$OLR (kgCOD m^{-3}d^{-1}) = \frac{Q(m^3 d^{-1}) * COD(kgCOD m^{-3})}{V(m^3)} = \frac{COD(kgCOD m^3)}{HRT(d)}$$

- Velocitat de flux ascendent:

La velocitat de flux ascendent típica va de 1-3 m/h on 1 m/h correspon a influents amb DQO parcialment soluble o aigües residuals domèstiques i 3 m/h quan tota la DQO és soluble.

A més, influeix en la mescla de l'aigua residual d'entrada i els bacteris anaerobis, fent que es redueixi la resistència a la transferència de masses, minimitza l'acumulació dels compostos intermediaris inhibitoris i estabilitza les condicions ambientals del reactor (Guardia, 2012).

$$V(m h^{-1}) = \frac{h(m)}{HRT(d)} = \frac{Q(m^3 h^{-1})}{A(m^2)}$$

- Volum i dimensions del reactor:

Per determinar les dimensions i el volum del reactor és necessari considerar la velocitat de càrrega orgànica, la velocitat de flux ascendent, el cabal i la DQO d'entrada (Metcalf i Eddy, 2004).

$$V_n = \frac{Q \cdot S_0}{L_{org}}$$

- on V_n és el volum nominal del reactor [m^3]
 Q és el cabal de l'influent [m^3/h]
 S_0 és la DQO que presenta l'influent [$kg\ DQO/m^3$]
 L_{org} és la velocitat de càrrega orgànica [$kg\ DQO/m^3 \cdot d$]

$$A = \frac{Q}{v}$$

- on A és l'àrea del reactor [m^2]
 Q és el cabal de l'influent [m^3/h]
 v és la velocitat de flux ascendent [m/h]

- Característiques físiques:

Les característiques físiques que requereixen més consideració són l'entrada d'alimentació, la separació de gas, la recollida de gas, i la retirada dels efluents.

L'entrada d'alimentació i la separació de gas són dissenys únics pel reactor UASB.

L'entrada d'influent s'ha de dissenyar de manera que aportí una distribució uniforme i eviti la formació d'espais morts (Metcalf i Eddy, 2004).

- Col·lector de gas i separador de sòlids (Separador Gas-Líquid-Sòlid):

El separador gas-líquid-sòlid (GLS) està dissenyat per recollir el biogàs, evitar el rentat dels sòlids i permetre que tornin cap al mantell i ajudar a millorar l'eliminació de sòlids de l'efluent (Metcalf i Eddy, 2004).

2.3.2 Procés de granulació

A continuació es descriu el procés de granulació, en base a tres teories o enfocaments diferents: físiques, microbianes i termodinàmiques.

Teories físiques

Les teories físiques expliquen la granulació considerant les condicions físiques que prevalen en el reactor. Líquids i gasos amb velocitats de flux ascendent, sòlids suspesos en l'efluent o fang, i el desgast i l'eliminació de l'excés de fangs del reactor són els factors responsables de la granulació.

- *Selection pressure theory:*

Sota condicions d'alta pressió de selecció, el fang lleuger i dispers es rentaran, mentre que els components més pesats seran retinguts en el reactor. Per tant, el creixement dels fangs dispersos es redueix al mínim i el creixement bacterià es delega a un nombre limitat de nuclis de creixement, que consisteixen en materials inerts orgànics i inorgànics o en petits agregats bacterians presents en el fang. Aquests nuclis de creixement augmenten de mida fins a un punt en que parts del grànul es desenganxen produint una nova generació de nuclis de creixement, i així successivament (Hulshoff *et al.*, 1983).

- *Growth of colonized suspended solids:*

Els grànuls s'originen de l'adhesió de partícules formades pel desgast i de la colonització dels sòlids suspesos en l'influent. Es considera que l'augment de la mida del grànul és només a causa del creixement i per tant, les capes concèntriques observades en els grànuls estan relacionats amb petites fluctuacions en les condicions de creixement (Pereboom *et al.*, 1994).

Teories microbianes

Des del punt de vista microbià, la granulació es basa en característiques de certs microorganismes. En aquest enfocament, els factors físics presentats anteriorment són normalment integrats.

- *Enfocament fisiològic:*

La producció de polímers extracel·lulars per alguns microorganismes sota certes condicions, es considera el factor responsable del fenomen de la granulació anaeròbia (Dolfing *et al.*, 1987).

- Cape Town hypothesis:

Segons aquesta teoria, la granulació depèn de *Methanobacterium* soca AZ, un microorganisme que usa H_2 com a font d'energia i és capaç de produir tots els aminoàcids que utilitza, menys cisteïna. Si hi ha amoni disponible, produeix molts aminoàcids i els allibera com un polipèptid extracel·lular, que unirà els *Methanobacterium* entre ells formant els grànuls (Sam-Soonet *et al.*, 1987).

- Enfocament ecològic:

Formació de ponts de microflòculs per filaments de *Methanothrix*: El mecanisme de granulació s'inicia pel recobriment dels filaments de *Methanothrix* per colònies de bacteries acidogènics, formant microflòculs de 10-50 mm.

A continuació, els filaments de *Methanothrix*, per la seva morfologia i propietats superficials particulars, poden establir ponts entre diversos microflòculs formant grànuls més grans (> 200 mm) (Dubourgier *et al.*, 1987).

Teories termodinàmiques

També s'ha analitzat el mecanisme de granulació en termes d'energia implicada en l'adherència, a causa de les interaccions fisicoquímiques entre les parets cel·lulars o entre les parets cel·lulars i superfícies adjacents. Aspectes com la hidrofobicitat i la mobilitat electroforètica es tenen en compte objectivament. També es contempla la influència de l'activitat de translocació de protons a través de la superfície de les membranes bacterianes provocant la seva activació.

Schmidt i Ahring (1996) proposen que el procés de granulació en un reactor UASB segueix el mateix procediment que la formació d'un biofilm.

- Transport de les cèl·lules cap a una superfície d'un material inert o d'altres cèl·lules.
- Adsorció inicial al substrat. Reversible per forces fisicoquímiques.
- Adhesió irreversible de les cèl·lules al substrat mitjançant apèndixs o polímers dels microorganismes.
- Divisió cel·lular i desenvolupament dels grànuls.

El més probable, també comentat per aquests autors, és que la granulació respongui a un conjunt dels fenòmens o processos previs.

2.3.3 Avantatges dels grànuls:

El procés de granulació permet taxes de càrrega orgànica en els reactors UASB molt més altes a les habitualment aplicades en processos de fangs actius convencionals. D'aquesta manera, a més de la reducció en els costos d'operació a causa de l'absència d'aireació, s'aconsegueix una reducció en la mida del reactor i una reducció en els costos d'inversió.

Dos factors possibiliten aquesta alta càrrega orgànica:

- Velocitat de sedimentació dels grànuls.

La velocitat de sedimentació de grànuls es troba al voltant de 216 m/s, mentre que la velocitat de flux ascendent superficial en els reactors UASB generalment es manté per sota de 7,2 m/s. Això permet un desacoblament del temps de retenció hidràulic amb el temps de retenció de sòlids. Temps de retenció de sòlids de més de 200 dies poden assolir-se amb un temps de retenció hidràulic de només 6 h.

- Les altes activitats metanogèniques del fang.

S'ha demostrat que les taxes de càrrega volumètrica altes de més de 50 kg de demanda química d'oxigen (DQO) per m^3 i dia podrien ser adequades en condicions mesòfiles, amb activitats metanogèniques específiques de més de 2 kg DQO / kg SSV · dia. Estudis sobre la micromorfologia dels grànuls demostren que les colònies de bacteris acetogènics estan estretament relacionats amb microcolònies d'arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfs, el que permet una eficient transferència d'hidrogen i, com a resultat, altes taxes de degradació (Hulshoff *et al.*, 2004).

2.3.4 Composició dels grànuls:

Els grànuls estan formats pels següents elements:

Materials inorgànics:

Els materials inorgànics (compostos de minerals i cendres) poden variar d'un 10 a un 90% en la composició dels grànuls depenent de l'influent usat, i de les condicions d'operació.

El color negre dels grànuls s'atribueix al FeS present en les cendres.

Microorganismes:

Els microorganismes inicien la formació de grànuls agregant-se entre ells i envoltant-se d'un polímer extracel·lular (PEC) entre d'altres compostos.

Polímer extracel·lular (PEC):

La generació del PEC normalment es considera com una propietat natural de les comunitats microbianes en l'ambient apropiat. El polímer extracel·lular es forma com a resultat de l'excreció de les cèl·lules com a matèria orgànica de rebuig. Es distingeixen dues classes de PEC: capsular i llimós. El capsular sempre es troba adherit a la cèl·lula mentre que el llimós es queda sense lligar a la cèl·lula (Gehr i Henry, 1983).

A la Figura 2.4. es poden veure amb detall grànuls observats amb microscopi electrònic així com la seva estructura interna.

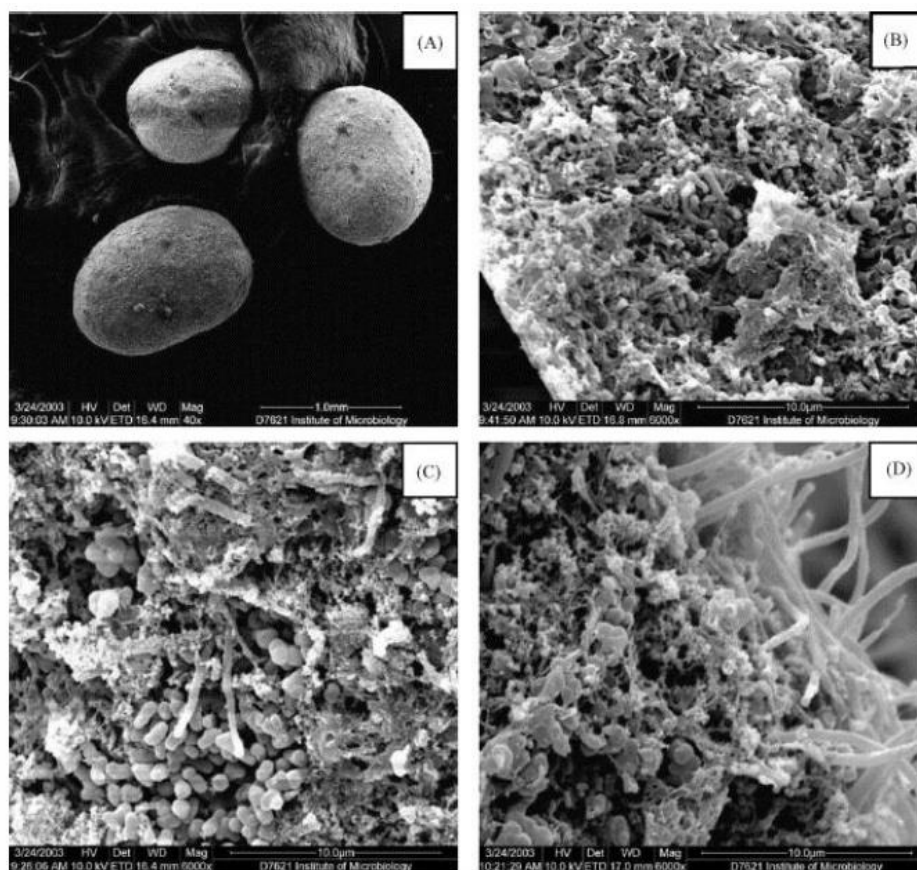


Figura 2.4. Micrografia amb microscopi electrònic de grànuls anaeròbis procedents d'un EGSB (Expanded Granular Sludge Bed). **(A)** Morfologia dels grànuls (augment 40x); **(B,C,D)** Estructura interna dels grànuls (augment 6000x). (Calderon, 2013).

2.3.5 Factors que afecten a la granulació:

A continuació es fa una descripció de com afecten diferents factors en la formació de grànuls (Habeeb *et al.*, 2011).

Temperatura:

El rang òptim de temperatura en reactors mesòfils és de 30-40°C, mentre que en termòfils es parla de 50-55°C. No obstant, augmentar la temperatura del reactor resultarà amb la prosperitat d'algunes espècies i la desaparició d'altres.

Velocitat de càrrega orgànica:

La VCO pot ser el paràmetre més crític que cal ajustar, ja que a altes velocitats de càrrega es produeix una acumulació d'àcids grassos volàtils i a baixes velocitats de càrrega orgànica es desintegren els grànuls. És recomanable tenir ≥ 1.5 kg DQO/m³·d per assegurar que no es desintegren els grànuls.

pH i alcalinitat:

Normalment un pH neutre afavoreix la formació de grànuls de qualitat. En aquest context és molt important l'alcalinitat, que neutralitza les fluctuacions de pH que puguin produir els AGV a causa de l'elevada càrrega orgànica.

Nutrients:

Nitrogen, fòsfor i sulfurs són imprescindibles per aconseguir un bon desenvolupament dels grànuls. Sobretot el nitrogen en forma d'amoni, ja que els microorganismes metanogènics utilitzen l'amoni com a font d'alimentació accelerant l'activitat dels grànuls durant la fase metanogènica.

Cations:

S'ha comprovat que la presència de cations accelera la formació de grànuls connectant diverses càrregues de les cèl·lules amb el polímer extracel·lular. D'entre ells, el calci millora l'efectivitat de formació dels grànuls. Ajuda en el procés d'adhesió entre les cèl·lules i el PEC. D'altra banda, l'excés de calci pot causar la inhibició del creixement dels grànuls.

2.4 Processos combinats: Digestió anaeròbia + BES (sistemes bioelectroquímics)

Recentment ha sorgit un interès per la combinació de digestors anaerobis amb sistemes bioelectroquímics (BES) per tal d'aconseguir millorar el tractament dels residus, recuperar energia, nutrients o produir productes d'alt valor afegit.

Els sistemes bioelectroquímics (bioelectrochemical systems, BES) són tecnologies emergents que utilitzen microorganismes units a un o als dos bioelectrodes per catalitzar reaccions d'oxidació en el cas d'un bioànode i/o de reducció en el cas d'un biocàtode (Rabaey i Verstraete, 2009).

Els BES poden classificar-se en cèl·lules de combustible microbiana (microbial fuel cell, MFC) si es produeix energia elèctrica, o bé, cèl·lules d'electròlisi microbiana (microbial electrolysis cell, MEC) si l'energia elèctrica es subministra per afavorir una reacció no espontània (Hamelers *et al.*, 2010; Villano *et al.*, 2012).

Per facilitar l'operació dels sistemes bioelectroquímics, s'ha d'aportar un donador d'electrons primari a l'ànode i un acceptor final d'electrons al càtode. L'avantatge dels BES és que no només poden convertir compostos, sinó també mantenir separats els productes d'oxidació i reducció, ja que generalment consten de dos compartiments separats per una membrana (Hamelers *et al.*, 2010).

El 1910, Potter va declarar, "la desintegració de compostos orgànics per microorganismes està acompanyada per l'alliberament d'energia elèctrica". Seguint aquesta idea, la recerca en BES també s'ha dirigit a la producció d'electricitat en MFC i aplicacions en MEC, utilitzant microorganismes com a biocatalitzadors que produeixen diferents productes de valor afegit com H_2 , CH_4 , el H_2O_2 , o etanol (Rozendal *et al.*, 2008; Rabaey *et al.*, 2006).

A la Figura 2.5. es presenta una descripció general de les possibles aplicacions d'un sistema bioelectroquímic de doble compartiment, amb les entrades i sortides (inputs i outputs) i les parts més importants. Les cambres de l'ànode i el càtode estan separades per una membrana. Aquesta membrana, però, no sempre és necessària.

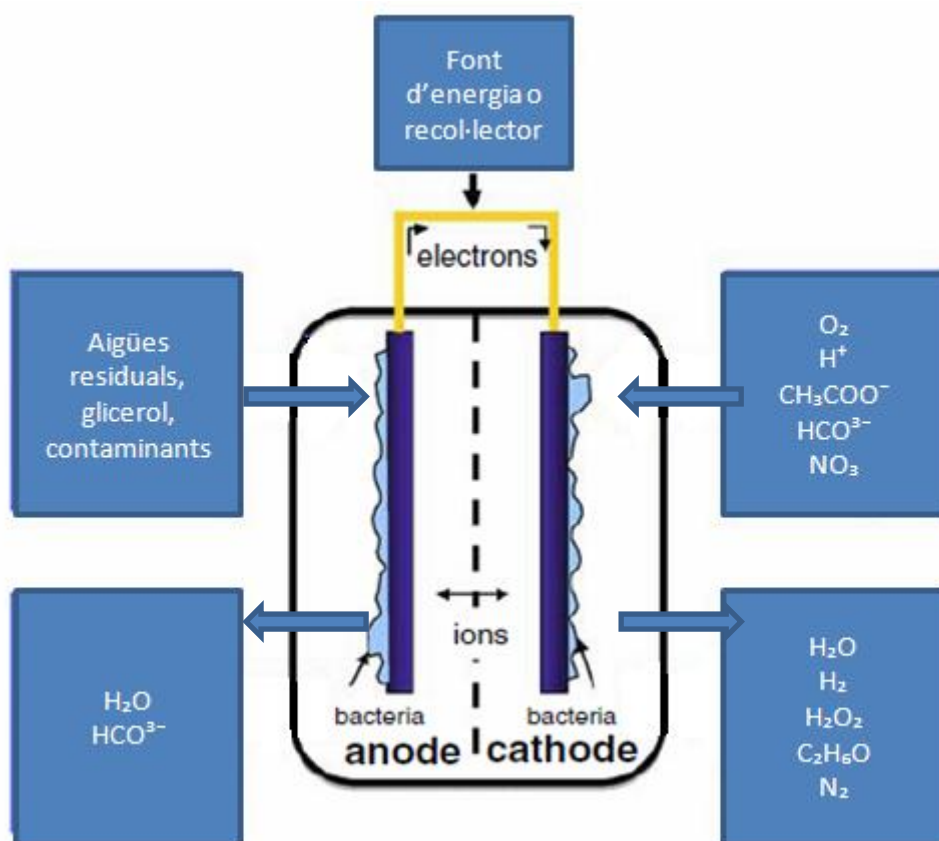


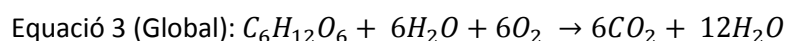
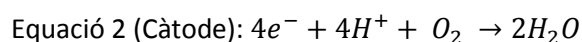
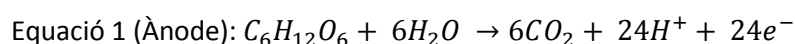
Figura 2.5. Inputs i Outputs d'un BES. Adaptació de (Hamelers, 2010).

2.4.1 Cèl·lula de combustible microbiana (MFC)

La cèl·lula de combustible microbiana (MFC) és un sistema bioelectroquímic que pot convertir directament l'energia química d'un substrat orgànic en energia elèctrica a través d'una sèrie de reaccions redox. El metabolisme microbià està vinculat a condicions de donador i acceptor d'electrons a través d'elèctrodes introduïts artificialment (ànode i càtode), que indueixen el desenvolupament d'una diferència de potencial, que actua com una força motriu neta per a l'activitat bioelectrogènica. (Logan *et al.*, 2006; Logan, 2008).

La MFC pot utilitzar un ample rang de residus orgànics complexos i aigües residuals com a substrat. Ofereix un doble benefici, generació d'energia renovable, i remediació de residus simultàniament (Rabaey *et al.*, 2006).

La funció primordial de la MFC és l'aprofitament dels electrons disponibles mitjançant la introducció d'elèctrodes com a receptors d'electrons. L'oxidació del substrat catalitzada per microorganismes té lloc a l'ànode (Eq. 1) on es generen equivalents reductors, mentre que la reducció es porta a terme en un càtode (Eq. 2). Els protons travessen la membrana d'intercanvi de protons i arriben al càtode per generar un potencial catòdic positiu. Els electrons romanents a l'ànode generen potencial anòdic negatiu. La reacció global implica la ruptura de substrat a diòxid de carboni i aigua amb una producció simultània d'electricitat com a subproducte (Eq. 3). La diferència entre els potencials catòdics positius i anòdics negatius es considera com una força motriu que condueix els electrons des de l'ànode al càtode (Mohan *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2004)



2.4.2 Cèl·lula d'electròlisi microbiana (MEC)

En els últims anys, s'han dedicat molts esforços al desenvolupament de BES per a la producció de H_2 basant-se en la tecnologia MFC. El procés, realitzat per una cèl·lula d'electròlisi microbiana (MEC), es diferencia d'una MFC convencional per tenir un càtode anaeròbic on els electrons alliberats en l'ànode per l'oxidació microbiana de substrats orgànics redueixen protons a H_2 en presència d'un catalitzador i per necessitar un aport extern d'energia. Les MEC són similars en el disseny de l'ànode de la MFC, però hi ha algunes diferències importants en el disseny del càtode. Pel fet que el producte final és hidrogen en lloc d'electricitat, l'estructura ha de ser modificada per poder recollir el gas produït (Logan, 2008).

En la majoria dels casos, per a afavorir la producció de H_2 en el càtode d'una MEC, la tensió generada a partir de l'oxidació microbiana d'un substrat en l'ànode ha de ser impulsada amb una font d'alimentació externa. En teoria, quan s'utilitza acetat com a substrat, es necessita aplicar una tensió de 0,14 V, sota condicions estàndard, perquè la producció de H_2 sigui energèticament favorable. Però a la pràctica, les tensions que s'han d'aplicar són més grans (0,2-1,0 V) a causa de diferents pèrdues de potencial que disminueixen l'energia que es pot obtenir a partir de la reacció (Ditzig *et al.*, 2007; Rozendal *et al.*, 2006).

Per tant, com podem veure a la Figura 2.6, els electrons alliberats en l'ànode per l'oxidació de la matèria orgànica s'usen per a la reducció de protons a hidrogen al càtode. La reacció catòdica requereix normalment un catalitzador per executar-se (Escapa *et al.*, 2014).

A més, com que les reaccions d'alliberament d'electrons estan separades físicament de les reaccions de producció d'hidrogen, la MEC té el potencial de superar dues principals desavantatges de la producció fermentativa d' H_2 , la necessitat d'utilitzar només substrats rics en carbohidrats i els baixos rendiments d' H_2 a causa de l'acumulació de productes secundaris, com acetat i butirat (Villano *et al.*, 2012).

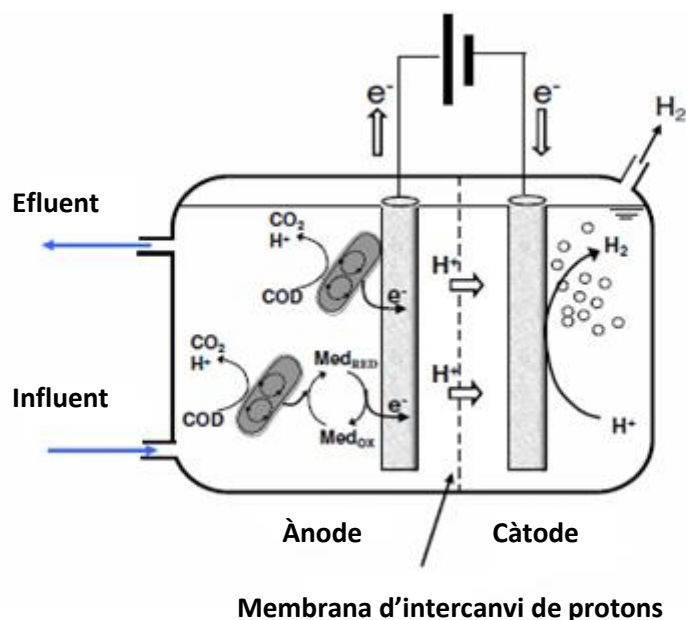
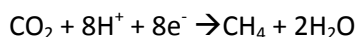


Figura 2.6 Esquema d'una MEC. Adaptació de Villano *et al.* (2012).

2.4.3 Generació de metà en sistemes bioelectroquímics

Una altra aplicació possible és la reducció electroquímica de diòxid de carboni a metà d'acord amb la següent reacció (Villano *et al.*, 2010):



Això suggereix que el metà pot ser produït sense un combustible orgànic, a aproximadament el mateix potencial necessari per a la producció d'hidrogen amb un combustible orgànic (com acetat). La producció de metà per la reacció anterior té l'avantatge afegit de la captura de CO_2 en un combustible (Cheng *et al.*, 2009).

Tant els electrons com el diòxid de carboni alliberat a l'ànode durant l'oxidació microbiana de la matèria orgànica, poden ser explotats per a la generació catòdica de metà, com es representa a la Figura 2.7.

En estudis recents s'han obtingut quantitats significatives de metà amb sistemes MEC. La font d'aquest metà sembla provenir de la transformació de l'acetat per metanògens acetoclàstics i de la transformació per metanògens hidrogenotròfics de l'hidrogen produït en el procés. En els digestors anaerobis, la major proporció de metà prové de l'acetat (70% aproximadament), mentre que en els sistemes MEC és més probable la seva generació a partir d'hidrogen (Cheng *et al.*, 2009).

La producció de metà a partir de CO_2 es pot aconseguir amb càtodes senzills de carbó, polaritzats a potencials més negatius de -650 mV (respecte estàndard d'hidrogen), en presència de metanògens hidrogenotròfics (Villano *et al.*, 2010; Villano *et al.*, 2012). Aquests poden catalitzar la reacció per dos mecanismes de transferència extracel·lular d'electrons: directe (els electrons s'agafen directament de l'elèctrode i són usats per reduir el CO_2 a metà) o indirecte (amb una producció intermèdia d'hidrogen) (Cheng *et al.*, 2009; Villano *et al.*, 2010)

En tot el rang de potencials catòdics investigats, només una fracció del metà es produeix a través de processos de transferència extracel·lulars d'electrons; la resta es produeix biològicament mitjançant metanogènesi hidrogenofílica, utilitzant hidrogen abiòticament produït a partir de la reducció d'aigua. La contribució relativa d'aquestes rutes a la producció global de metà és altament dependent del potencial conjunt del càtode (Villano *et al.*, 2010).

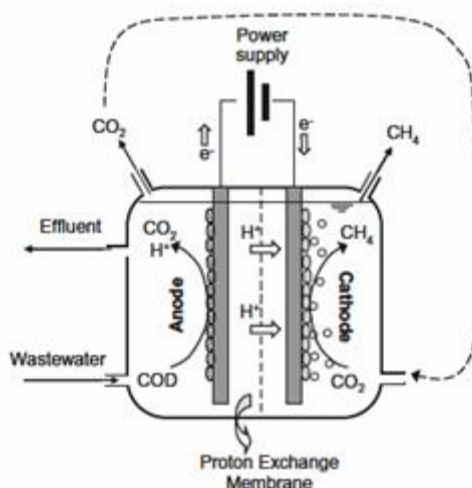


Figura 2.7. Esquem d'un sistema bioelectroquímic per al tractament d'aigües residuals i producció simultània de CH_4 basada en la reducció bioelectroquímica de CO_2 . Adaptació de (Villano *et al.*, 2010).

En comparació amb la digestió anaeròbia convencional, aquest procés podria oferir alguns avantatges específics, com ara la separació física en l'etapa d'oxidació de la matèria orgànica de residus de la producció de metà. Això permetria protegir els consorcis anaerobis contra compostos inhibidors presents en els fluxos de residus i per produir metà amb menor contingut en diòxid de carboni. A més, ja que les aigües residuals només flueix a través de la càmera anòdica, es requereix menys energia per mantenir el càtode a la temperatura desitjada (Villano *et al.*, 2010).

Un dels limitants d'aquest sistema és el llarg temps de posada en marxa dels biocàtodes, pel que la inoculació amb consorcis microbians enriquits en reactors anaerobis pot ser una bona alternativa per accelerar el procés. És aquesta hipòtesis la que es planteja comprovar amb aquest treball, el qual, tal com s'ha indicat, està emmarcat en un projecte de recerca de més gran abast.

3. Materials i mètodes

A continuació s'exposen els materials i mètodes de la part experimental del projecte. Aquest es va desenvolupar a les instal·lacions de l'IRTA a Torre Marimon, Caldes de Montbui, amb el suport i l'equipament del grup de Gestió Integral de Residus Orgànics (GIRO).

3.1. Reactor UASB

La Figura 3.1 i 3.2 mostren la configuració del reactor UASB utilitzat en el projecte. El reactor consta d'un cos cilíndric encamisat de vidre de 0,6 m d'alçada i 0,04 m de diàmetre, amb un volum nominal de 0,7 L. L'entrada d'influent es realitza per la part inferior del reactor mitjançant un bomba peristàltica DINKO de flux variable model D-25V (0,001 - 4,025 mL/minut). Es manté l'agitació mitjançant una recirculació amb una bomba peristàltica WATSON MARLOW 520S (0.1-220 rpm). La sortida de l'efluent es realitza per la part superior del reactor, i es recull en un baló de vidre d'una capacitat de 2 L. El sistema està equipat amb un cabalímetre μ Folw, de Bioprocess control, per mesurar el cabal de biogas produït. Per tal de mantenir la temperatura del reactor a 37 °C, es recircula, per la camisa exterior del reactor, aigua calenta escalfada mitjançant un bany termostàtic Selecta Ultraterm-200.

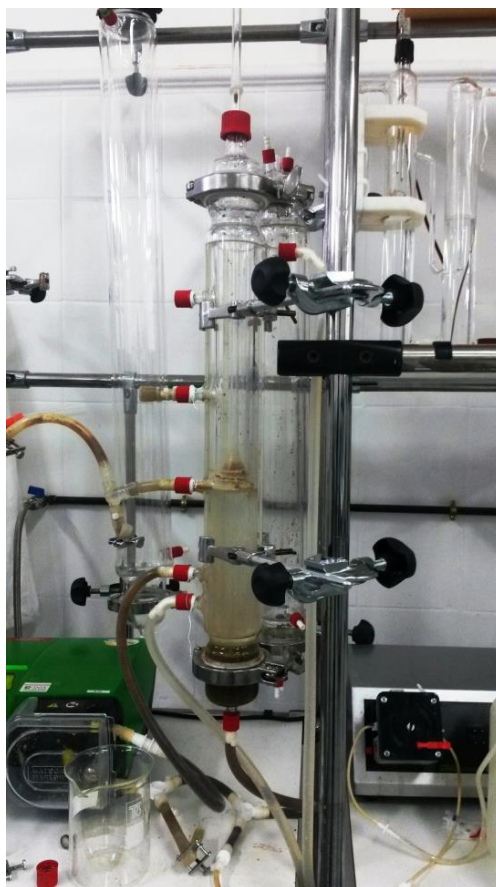


Figura 3.1 Muntatge experimental del reactor UASB.

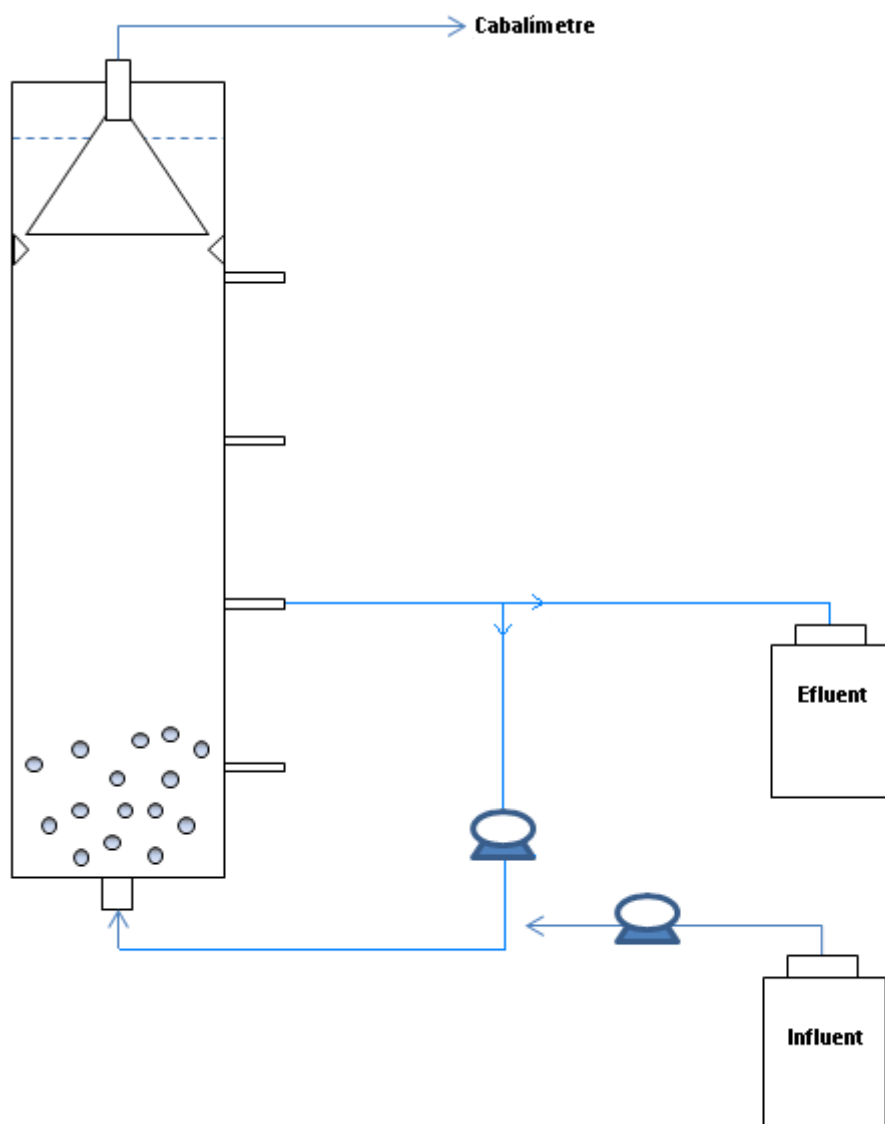


Figura 3.2 Esquema del muntatge experimental del reactor UASB.

3.2. Operació del reactor

El reactor es va inocular amb 0,1 L de fang granular (figura 3.3) procedent d'un reactor d'escala industrial que tracta les aigües residuals de l'empresa Nufri, de Mollerussa. Aquest fang anaerobi presenta una concentració de 59,60 g SSV/kg.



Figura 3.3 Fang granular usat com a inòcul en el reactor UASB.

Inicialment el reactor es va operar amb un volum útil de 0,25 L i en el dia 199 es va augmentar fins 0,5 L.

El reactor s'ha alimentat amb dos tipus d'influents sintètics. En un primer període, posada en marxa i activació dels grànuls, es va utilitzar àcid acètic com a font de carboni en concentracions creixents (de 1,016 g/L a 3,150 g/L) per tal d'activar la biomassa (portava un període molt llarg en condicions de refrigeració 4 °C) i aclimatar-la a altes càrregues orgàniques. D'aquesta manera la velocitat de càrrega orgànica inicial de 3 kg DQO/m³·dia s'augmentà gradualment fins a 10 kg DQO/m³·dia.

En un segon període, l'àcid acètic va ser progressivament substituït per metanol, per tal d'afavorir l'enriquiment de la biomassa del reactor en arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics, amb l'objectiu d'aconseguir una biomassa adequada per inocular el biocàtode del sistema bioelectroquímic, que pretén produir CH₄ a partir de CO₂, activitat que forma part del mateix projecte de recerca.

La Taula 3.1 mostra els diferents períodes d'operació amb la variació de VCO i la substitució progressiva d'àcid acètic per metanol. A la Taula 3.2 i a la Taula 3.3 hi ha representades les concentracions de nutrients usades per a l'alimentació, així com la composició de les solucions d'elements traça i clorur de calci. L'influent, en tots els casos, presenta els mateixos valors de Mg, P, K, Ca, NH₄⁺, elements traça i extracte de llevat.

Taula 3.1 Períodes operacionals del reactor.

Període	Temps (dies)	VCO (kg DQO/m ³ ·dia)	Concentració d'àcid acètic (g/L)	Concentració de metanol (g/L)
1.1	133	3,25	1,016	0
1.2	7	4,88	1,524	0
1.3	7	6,05	1,892	0
1.4	7	8,44	2,638	0
1.5	64	10,08	3,150	0
2.1	7	10,08	2,01	0,53
2.2	7	10,08	1,34	1,06
2.3	7	10,08	0,67	1,58
3.1	-	10,08	0	2,11

Taula 3.2 Composició de l'influent.

Component	Comentaris	Concentració	Unitats
Font de carboni	Àcid acètic	1,016 – 3,150	g/L
	Metanol	0,528 – 2,112	g/L
NH₄Cl	C/N/P = 100/10/1	1,33	g/L
Elements traça	Solució	1	mL/L
CaCl₂	Solució	4	mL/L
Tampó Fosfat	Na ₂ HPO ₄	6	g/L
Tampó Fosfat	KH ₂ PO ₄	3	g/L
Sulfat de magnesi	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,246	g/L
Extracte de llevat		0,1	g/L

Taula 3.3 Composició de les solucions usades en l'influent.

Solució	Components	Concentració	Unitats
Solució de CaCl_2	CaCl_2	10	g/L
Solució d'elements traça	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5	g/L
	H_3BO_3	0,15	g/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03	g/L
	KI	0,18	g/L
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,12	g/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06	g/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,12	g/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,15	g/L
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,023	g/L
	EDTA	10	g/L

Durant tot el període de funcionament es va mantenir un temps de retenció hidràulic (TRH) de 6 h i la recirculació a raó de 570 mL/min.

Durant la primera etapa de funcionament del reactor es va detectar que els grànuls s'estaven desestructurant i per aquest motiu es va ajustar l'alimentació seguint les especificacions sobre requeriments de micronutrients dels grànuls d'un reactor UASB (Singh *et al.*, 1999). Així mateix, la configuració inicial del reactor va ser modificada diverses vegades durant el projecte per evitar entrada d'oxigen a l'interior i solucionar problemes de lectura de biogàs.

Periòdicament es prenen mostres tant de l'influent com de l'efluent per analitzar la DQO, AGV i pH, així com la composició de biogàs dins el reactor. D'aquesta manera es va determinar la producció estimada de biogàs/metà, tenint en compte la degradació de DQO, per poder-la comparar amb la mesura experimental.

3.3. Assajos d'activitat metanogènica

L'objectiu d'aquests assajos és l'estimació de l'activitat metanogènica específica d'un determinat fang anaerobi.

La velocitat de càrrega orgànica màxima que ha d'aplicar-se a un reactor anaerobi pot ser aproximada coneixent la quantitat total de fang al reactor i la seva activitat metanogènica. Un control periòdic del fang permet detectar l'enriquiment del fang o el seu deteriorament degut a toxicitat, deficiència de nutrients acumulació de sòlids suspesos, etc.

L'assaig d'activitat consisteix en realitzar un assaig en discontinu amb diferents substrats i una quantitat d'inòcul coneguda. S'utilitzen vials de 120 mL amb àcid acètic, mix-AGV i H₂ com a substrats, així com solucions de macro i micronutrients i bicarbonat com a agent tampó.

La mesura de l'activitat es realitza mitjançant el seguiment de la producció de CH₄ al llarg del temps.

Previ a l'inici de l'assaig es realitza una caracterització tant del substrat com de l'inòcul, mesurant-n'he la concentració de Sòlids Suspesos (totals i volàtils) i la DQO.

La concentració d'inòcul depèn de les condicions de l'assaig i del tipus d'inòcul. Es recomana una concentració entre 1,0 – 1,5 g SSV/L medi. Per 1000 mL de medi serà:

$$V_{\text{inòcul}}(\text{mL}) = \frac{1,5 \cdot 1000}{SSV \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}$$

Cal afegir la quantitat corresponent de solució de macronutrients, 0,01 mL_{solució}/mL_{medi}, i micronutrients, 0,001 mL_{solució}/mL_{medi} (Taula 3.4 i Taula 3.5).

Així mateix, s'ha d'afegir bicarbonat de sodi per assegurar la relació 1g NaHCO₃ per g DQO i afegir la quantitat necessària d'àcids per aconseguir una concentració final de 5g DQO/L.

Taula 3.4 Composició de les dissolucions de macronutrients.

Macronutrients		Concentració solució (g/L)
Solució 1	NHCl ₄	17,00
Solució 2	K ₂ HPO ₄	3,70
Solució 3	MgSO ₃	0,56
Solució 4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,80

Taula 3.5 Composició de la dissolució de micronutrients.

Micronutrients		Concentració solució (g/L)
Solució 5	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,00
	H_3BO_3	0,05
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,07
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,09
	EDTA	0,50
	GCl 36%	1 ml/L
	Na_2SeO_3	0,07
	Resazurina	0,50

Per acabar s'omplen els vials amb aigua desionitzada fins a 50 mL i es borboteja 3 minuts cada vial amb N_2 per tal de desplaçar l' O_2 a l'exterior, posant dos xeringues en el sèptum, una d'entrada del gas i l'altre de sortida.

Els vials van fer-se per duplicat i van incubar-se a 37 °C en una cambra d'incubació. També es van preparar vials de control, amb només la biomassa i el medi anaerobi, per estimar la producció neta de biogàs a partir de cada substrat.

A la Figura 3.4 es mostren els vials utilitzats per els assajos d'activitat metanogènica.



Figura 3.4 Preparació dels vials per assaig d'activitat metanogènica.

Durant el període d'adaptació i activació dels grànuls amb àcid acètic s'han realitzat dos assajos d'activitat per comprovar l'activació dels grànuls a temps inicial i final de període respectivament

El primer assaig d'activitat es va realitzar al temps inicial (inici del període 1.1) per caracteritzar els grànuls i observar l'evolució respecte diferents moments d'operació del reactor. El segon, al final de l'etapa d'alimentació amb àcid acètic (final del període 1.5).

3.4. Mètodes analítics

3.4.1 pH

El pH es mesura, amb un elèctrode CRISON 52-11 connectat a un pH/mV metre CRISON GLP 22 (Figura 3.5), prèviament calibrat amb una solució *buffer* estàndard CRISON de pH 7,02 i 4,22 a una temperatura de 20 °C.



Figura 3.5 pH/mV metre CRISON GLP 22

3.4.2 Sòlids Suspesos Totals (SST) i Sòlids Suspesos Volàtils (SSV)

Es va analitzar la quantitat de SST/SSV del fang granular per tenir una idea de la quantitat de biomassa present en aquest.

Els sòlids suspesos totals es van determinar pel pes dels grànuls secs, filtrats prèviament, i assecats en l'estufa a 105 °C, durant 48 hores. La següent expressió s'usa per calcular el contingut en SST:

$$SST(\%) = \frac{C - A}{B} \cdot 100$$

La determinació de sòlids suspesos volàtils es va realitzar en la mateixa mostra per calcinació en una mufla 12-PR / 300 Heron, a 550 °C durant 6 hores. El contingut de sòlids en suspensió volàtils es determina per diferència entre el residu sec i la cendra segons l'expressió:

$$SSV(\%) = \frac{C - D}{B} \cdot 100$$

A = pes del gresol + pes filtre

B = pes de la mostra

C = pes del gresol + pes filtre + pes de la mostra seca

D = pes del gresol + pes filtre + cendres

3.4.3 Demanda Química d'Oxigen (DQO)

La demanda química d'oxigen (DQO) és una estimació de la matèria orgànica oxidable a partir de la quantitat d'oxigen requerit per oxidar la matèria orgànica en una mostra sota condicions específiques d'agents oxidants, temps i temperatura. No és directament assimilable a la matèria orgànica total que es determinaria per carboni orgànic total (COT) però es una determinació molt freqüent en els processos biològics de tractament d'aigües i residus orgànics.

Les substàncies orgàniques i inorgàniques s'oxiden per la digestió de la mostra en una solució de Ag_2SO_4 amb un excés de dicromat de potassi ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a 148°C durant 2 hores. Les dificultats causades per la presència dels halurs poden superar-se en bona part per complexament amb sulfat de mercuri (HgSO_4), que forma l'halur mercurí corresponent, molt poc soluble en medi aquós. La digestió es realitza en un digestor Hach Lange LT i la lectura d'absorbància en un espectofotòmetre Hach Lange DR2800.

Després de la digestió, el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ restant sense reduir es determina espectofotomètricament a una longitud d'ona de 605 nm. La matèria orgànica oxidable es calcula en termes d'oxigen equivalent. A la Figura 3.6 podem veure l'aspecte d'unes mostres ja digerides, abans de la lectura espectofotomètrica.



Figura 3.6 Mostres preparades per analitzar la DQO

Per tal de mesurar la DQO soluble i no la possible biomassa que es pugui escapar del reactor, les mostres s'han centrifugat a 13000 rpm durant 10 minuts, prèviament a l'anàlisi de la DQO.

3.4.4 Composició del biogàs

La composició del biogàs, tant en els assajos d'activitat com en el seguiment del reactor UASB es van analitzar per cromatografia de gasos.

Aquest mètode es basa en la separació cromatogràfica dels diferents compostos de la mostra gasosa (N_2 , CH_4 , CO_2), gràcies a la diferent afinitat de cadascun d'ells per la fase estacionària, i la detecció mitjançant TCD (detector de conductivitat tèrmica).

L'equip utilitzat és un cromatògraf VARIAN CP-3800 (Figura 3.7) equipat amb dos injectors on-column (Mod. 1041), dos detectors TCD (FRONT/MIDDLE), una columna VARIAN HAYESEP-Q 80-100 MESH (2mx1/8"x2.0mm SS) i una columna VARIAN MOLECULAR SIEVE 5A 80-100 MESH (2mx1/8"x2.0mm SS).

Per l'anàlisi s'agafen 200 μ L de mostra gasosa de l'espai de cap del reactor amb una xeringa i s'injecta manualment a la columna del cromatògraf.



Figura 3.7 Cromatògraf VARIAN CP-3800

3.4.5 Àcids Grassos Volàtils (AGV)

Els àcids determinats són àcid acètic, àcid propiònic, àcid iso i n-butíric, àcid iso i n-valèric, àcid iso i n-capròic i àcid heptanòic. Aquest compostos són importants intermediaris del procés anaerobi i habitualment s'utilitzen com un indicador del seu bon funcionament.

L'equip utilitzat és un cromatògraf de gasos VARIAN CP-3800, amb detector FID equipat amb una columna cromatogràfica capil·lar del tipus: TRB-FFAP (Free fatty acids phase) de 15m x 0,53 mm x 0,5 µm.

El procediment és el següent: es realitza una preparació amb Tert-Buthyl Methyl Ether i Èter dietílic com a reactius per separar la mostra en dues fases: la fase estacionaria, que conté una superfície d'exposició molt gran, i la fase mòbil, que es un gas que circula en contacte amb la fase estacionària. La mostra (Figura 3.8) s'introdueix a l'injector del cromatògraf, on es vaporitza i és transportada a la columna. Aquesta columna està dintre d'un forn de temperatura variable, on es realitza la separació dels components de la mostra

El detector del cromatògraf produeix una senyal elèctrica proporcional a la quantitat de matèria present de cada component. Aquesta senyal es enviada a un sistema de registre i integració, el qual genera un gràfic d'intensitat en funció del temps, un cromatograma (Figura 3.9).

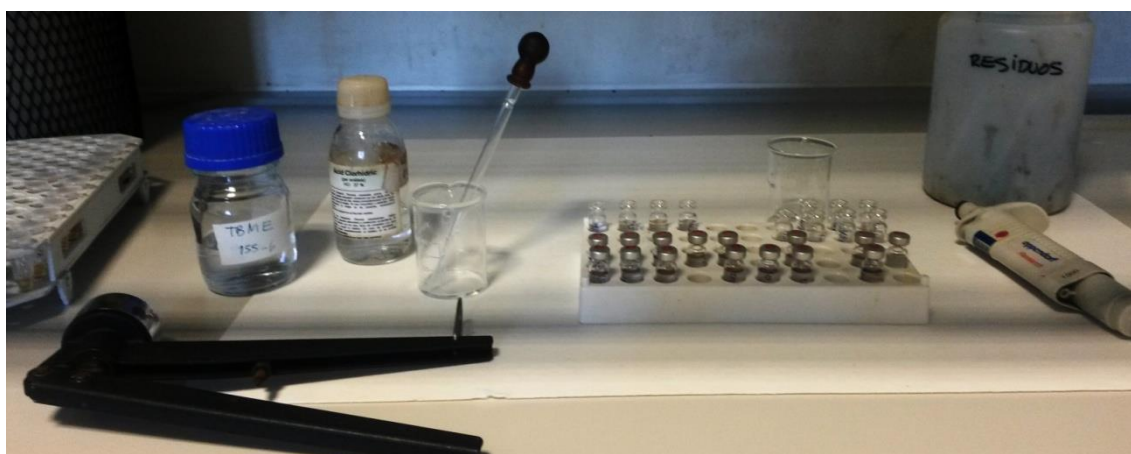


Figura 3.8 Preparació de vials per determinar el seu contingut d'AGV's.

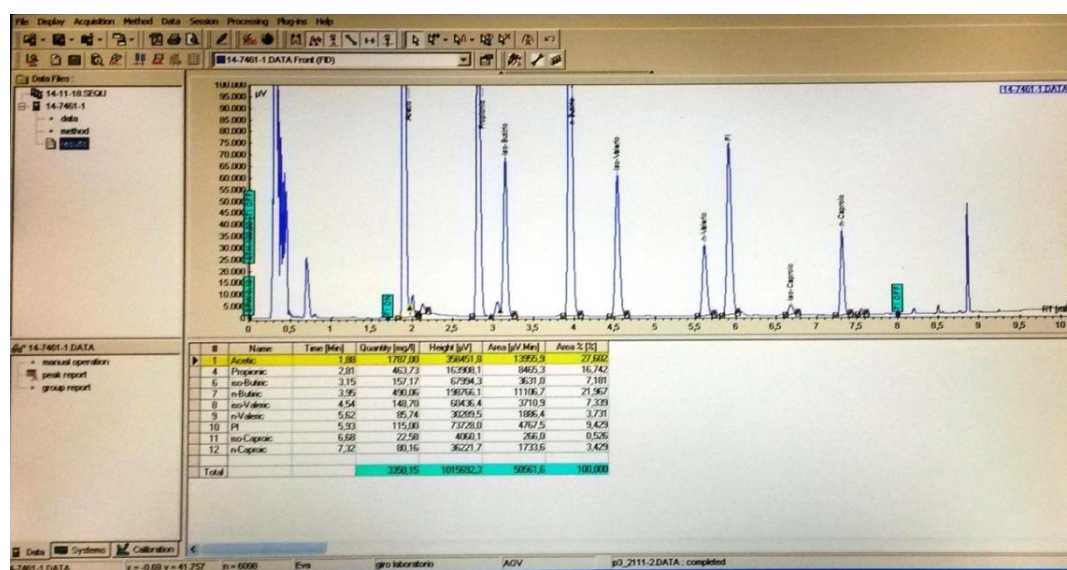


Figura 3.9 Exemple de cromatograma d'àcids grassos volàtils d'una mostra de purí fresc.

4. Resultats i discussió

A continuació es presenten els resultats i discussió dels aspectes més rellevants dels assajos realitzats.

4.1 Evolució de la velocitat de càrrega orgànica

Tal com s'ha descrit a l'apartat anterior (Materials i mètodes), l'operació del reactor es divideix en tres períodes (Taula 3.1).

En el primer període, el reactor va ésser alimentat amb àcid acètic. En el segon, es va procedir a la substitució d'àcid acètic per metanol, i en el tercer, es va alimentar només amb metanol.

El primer període va durar un total de 215. Correspon a la posada en marxa del reactor i a la realització de millores en el disseny. A la meitat d'aquest període (P1.1) es va veure que els grànuls s'estaven desestructurant, per la qual cosa es va procedir a la seva substitució, reinoculant el reactor. A més, en aquest punt es va modificar la composició de l'alimentació sintètica per tal d'afavorir el procés de granulació i evitar aquest problema. Es va augmentar la concentració de clorur de calci fins a 40 g/L i es va complementar l'influent amb extracte de llevat a raó de 0,1 g/L d'acord amb Singh *et al.* (1999), Baêta *et al.* (2012) i Yamada *et al.* (2011).

Després de la reinoculació, un cop es va considerar que els grànuls estaven prou adaptats, es va procedir a incrementar la velocitat de càrrega orgànica. Això es va fer augmentat de manera esglaonada, setmanalment, la concentració d'àcid acètic de l'influent per aclimatar els microorganismes a velocitats de càrrega orgànica elevades. A la Figura 4.1 es presenta l'evolució de la VCO.

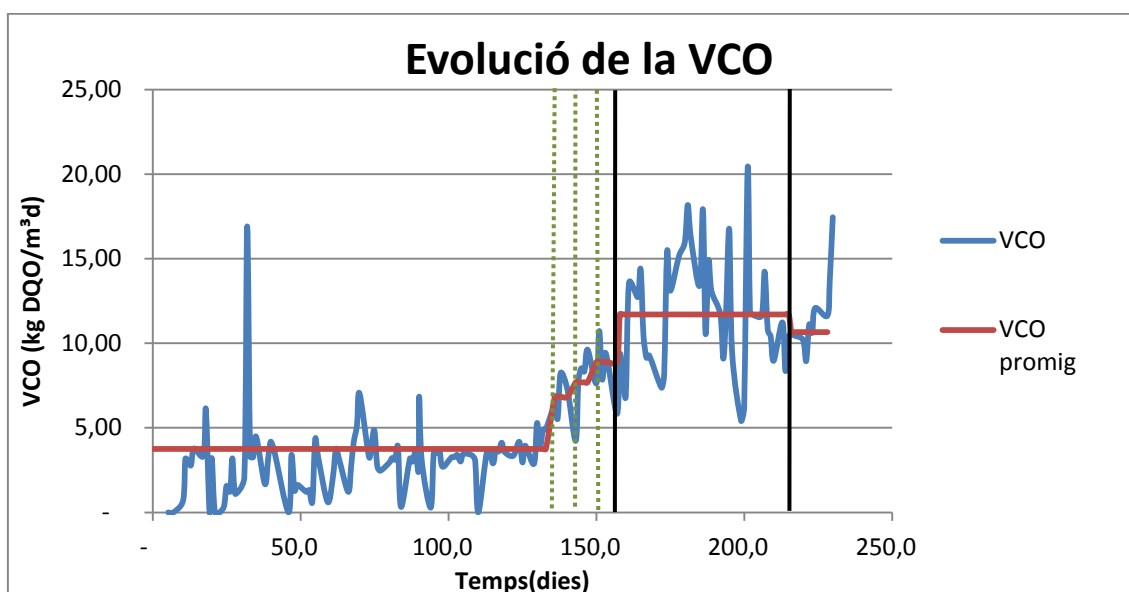


Figura 4.1 Evolució de la velocitat de càrrega orgànica experimental i teòrica. Les línies discontinues verdes marquen l'augment esglaonat de la VCO i les negres delimiten els períodes 1, 2 i 3.

Passats més de 150 dies d'operació i amb la VCO establerta a 10 kg DQO/m³·dia, es va instal·lar un sífó a la sortida de l'efluent per evitar l'entrada d'oxigen de l'exterior, i es va augmentar el volum útil del reactor, de 0,25 a 0,5 L, per reduir l'espai de cap, evitant així l'acumulació de biogàs dins aquest.

El segon període començà als 215 dies d'operació i la seva durada va ser més curta que l'anterior, aproximadament un mes. Durant aquest temps es va anar substituint l'àcid acètic per metanol setmanalment, com s'ha indicat a la Taula 3.1. Amb aquest canvi es pretenia enriquir la població microbiana en arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics.

Finalment, el tercer període és en el que el reactor s'alimenta només amb metanol a l'espera d'observar un enriquiment amb arqueobacteris metanogènics hidrogenotròfics. Amb l'objectiu d'avaluar aquest enriquiment, s'han pres mostres de biomassa del reactor, corresponents a l'inòcul inicial i grànuls del final del període 2 (previ a l'inici de substitució d'àcid acètic per metanol en l'alimentació).

Al final del període 3, d'alimentació exclusivament amb metanol, s'agafarà mostra dels grànuls. Aquestes mostres seran analitzades per piroseqüenciació per determinar així si s'ha assolit l'objectiu. Aquests resultats no són objecte d'aquest projecte.

4.2 Evolució de l'eliminació de la demanda química d'oxigen

Es va realitzar el seguiment de la DQO_s durant tot el procés per determinar l'eficiència d'eliminació. A les Figures 4.2 i 4.3 es presenta la comparativa entre entrada i sortida de DQO i el % de degradació de DQO_s respectivament.

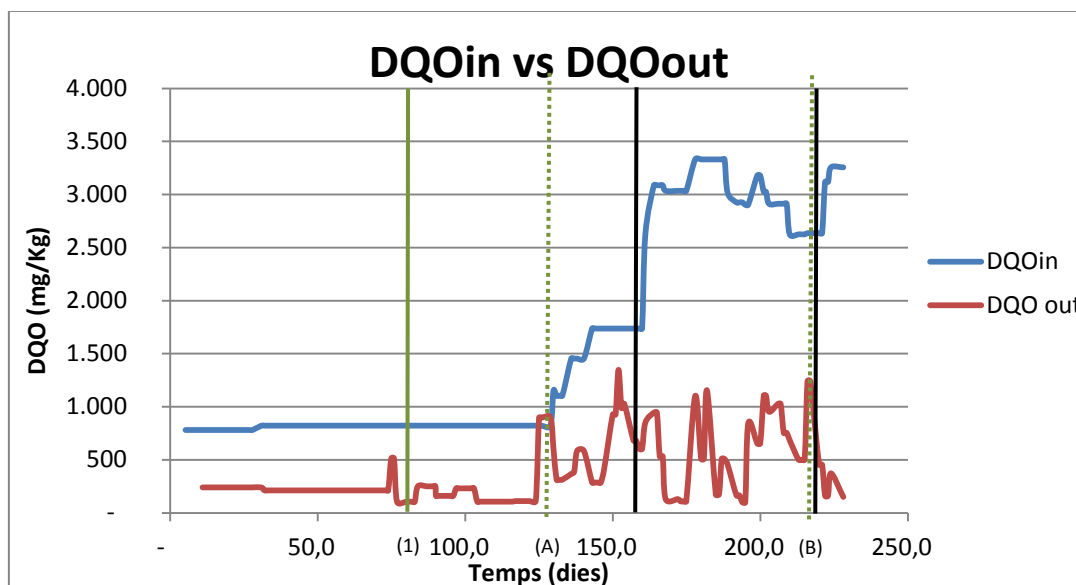


Figura 4.2 Evolució de la DQO_s de l'influent i de l'efluent. Les línies discontinues verticals (A) i (B) indiquen l'augment de VCO i la substitució d'àcid acètic per metanol respectivament. La línia contínua (1) representa la reinoculació. Les línies negres delimiten els períodes 1, 2 i 3.

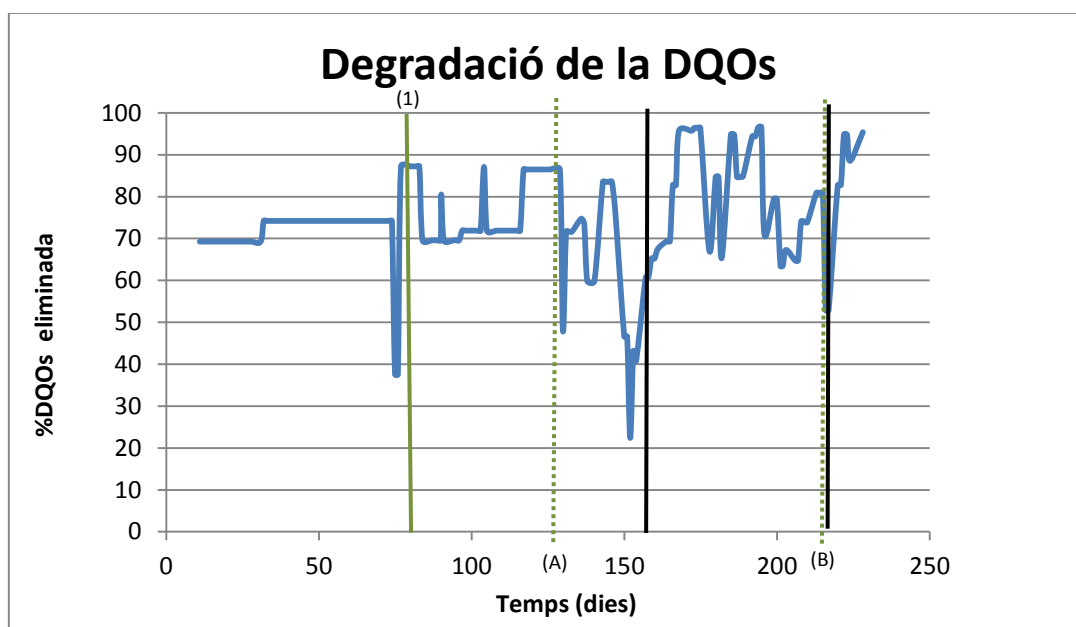


Figura 4.3 Degradació de la DQO_s en el reactor UASB. Les línies discontinues verticals (A) i (B) indiquen l'augment de VCO i la substitució d'àcid acètic per metanol respectivament. La línia contínua (1) representa la reinoculació. Les línies negres delimiten els períodes 1, 2 i 3.

Tal com es pot veure a la Figura 4.2 durant el període inicial, mentre la VCO es manté a 3 kg DQO/ m³·dia l'eliminació de DQO es manté en un valor promig de 74 %. A partir del dia 136 (primer augment de VCO) es detecta un augment de la DQO de l'efluent. Tot i així, es va comprovar que els microorganismes s'adaptaven bé, ja que la DQO de l'efluent retornava a nivells baixos poc després dels canvis. D'aquesta manera, la degradació de DQO (Figura 4.3) va augmentar, quan s'assolí la VCO de 10 kg DQO/m³·dia, d'un 70% al principi fins al 95%, un valor superior a altres experiments realitzats anteriorment per De Zeeuw i Lettinga (1980), Brummeler *et al.* (1985) i Wiegant i de Man (1986) que aconseguiren el 80, 60 i 87 % de degradació respectivament amb condicions d'operació similars.

Respecte al canvi a metanol (dia 215), en un primer moment es va observar un decrement en la degradació de DQO fins el 50%, però el reactor es va recuperar ràpidament assolint de nou el 95% de degradació. L'eficiència d'eliminació de DQO obtingut en aquest treball amb metanol és comparable o superior a l'aconseguida en altres estudis de tractament anaeròbic en reactors UASB amb metanol com a alimentació. Driessen *et al.* (2000) van aconseguir 75-80% d'eliminació de la DQO, amb una major concentració de metanol (4,5 g DQO/ L); i Bandshah *et al.* (2012) van aconseguir eficiències d'entre 89-92 % amb una DQO_{in} de 10 g/L.

Taula 4.1 Taula resum de les dades experimentals durant l'operació del reactor.

Període	Temps (dies)	Promig VCO (kg DQO/m ³ ·dia)	Promig eliminació DQO (%)	Promig CH ₄ (%)
1.1	133	3,11	73,43	46,86
1.2	7	6,32	70,27	38,40
1.3	7	7,68	76,23	29,00
1.4	64	11,42	74,87	57,64
2.1	7	10,10	70,44	70,00
2.2	7	11,81	93,85	80,80
2.3	7	13,38	96,28	81,33
3.1	-	-	-	-

4.3 Evolució dels Àcids Grassos Volàtils

La concentració d'AGVs de l'efluent es va analitzar periòdicament per comprovar la seva degradació en el reactor. A més, d'aquesta manera, es va comprovar l'eliminació de DQO, ja que la única font de carboni en l'influent era àcid acètic i llevat.

L'evolució dels àcids grassos volàtils es presenta a continuació a la Figures 4.4.

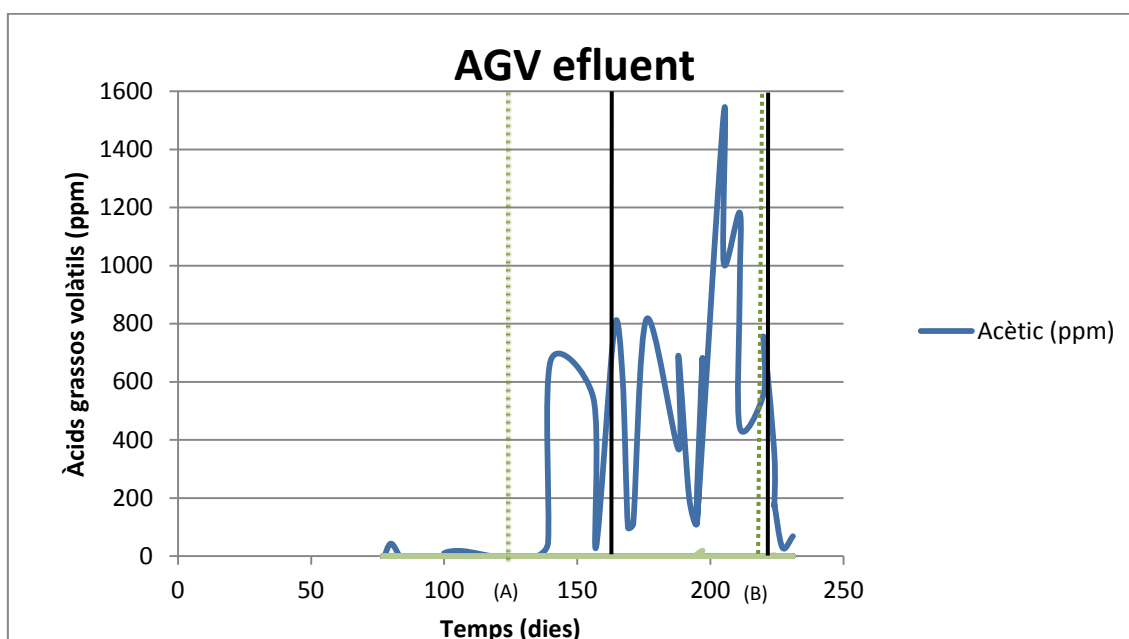


Figura 4.4 Concentració d'àcids grassos volàtils a l'efluent. Les línies discontinúes verticals (A) i (B) indiquen l'augment de VCO i la substitució d'àcid acètic per metanol respectivament.

Tal com es pot observar a la Figura 4.4 el contingut d'AGV a l'efluent durant el període 1.1, en el que la VCO es manté constant a $3 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$, no és detectable. No és fins el període 1.2, en el que es va augmentant esglaonadament la VCO, quan es comença a detectar presència d'àcid acètic. Durant aquest període la concentració d'acètic s'acumula en el moment que s'incrementa la càrrega per acabar degradant-se al cap d'uns dies. Només durant un breu període, entre els dies 200 i 205, l'àcid acètic s'acumula per sobre de 800 ppm. Aquesta acumulació s'atribueix a un desajust en la velocitat de la bomba d'alimentació.

Els valors obtinguts d'àcid acètic es poden comparar amb els aconseguits per un bon funcionament d'un reactor UASB per Lettinga *et al.* (1980) i Fang *et al.* (1993) que no superaren el valor de 4000 ppm.

4.4 Evolució en la composició i producció del biogàs

La composició de biogàs (Figura 4.5) dins el reactor no va poder-se determinar correctament fins que es va implantar el sífó el dia 157 (marcat amb un (2) a la Figura 4.5) a la sortida de l'efluent, evitant així l'entrada d'oxigen de l'exterior que diluïa la barreja de gasos. A partir d'aquell moment la concentració de metà es va establir al voltant de 70-80%.

En el període 2, quan començà de l'àcid acètic per metanol en l'influent (punt (B)), s'aprecià un augment del contingut de CH_4 , establint-se al voltant del 83 %. Aquesta riquesa en CH_4 és comparable amb el que obtingueren Kobayashi *et al.* (2011) alimentant amb metanol, 80%.

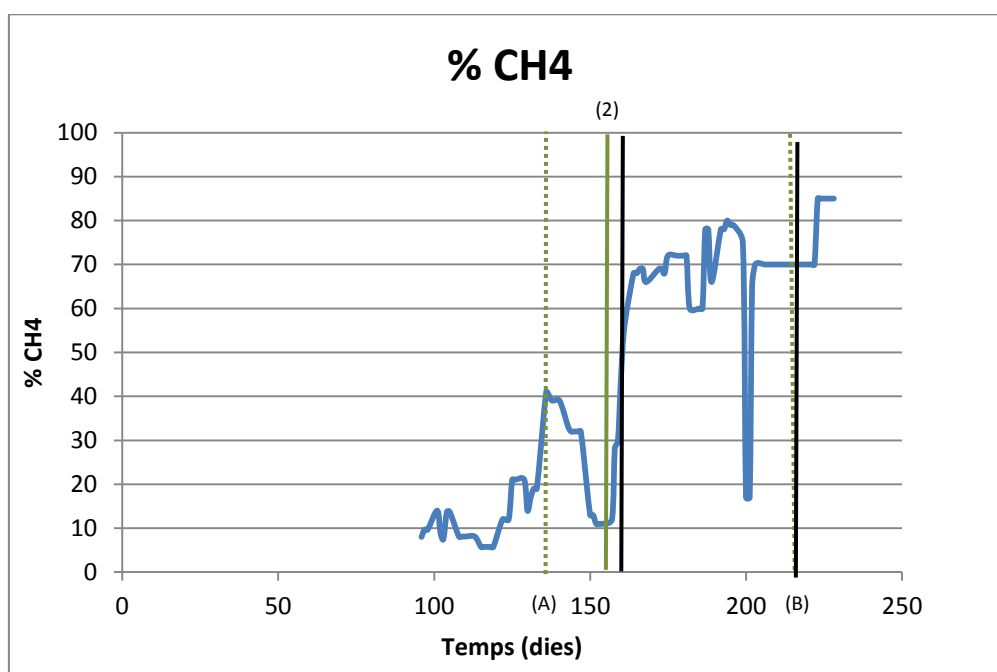


Figura 4.5 Concentració de metà en el reactor. Les línies discontinuïques verticals (A) i (B) indiquen l'augment de VCO i la substitució d'àcid acètic per metanol respectivament. Els punts remarcats en vermell corresponen a la obertura del reactor per agafar mostra. El punt (2) indica la instal·lació del sífó.

Tot i aquests canvis, la producció de metà generada no corresponia amb la producció teòrica estimada a partir de la degradació de DQO. Es creu que la causa van ser fugues sense identificar en el sistema. Per això, es va estimar la producció de metà de forma teòrica (Figura 4.6) la degradació de DQO i la concentració de metà seguint l'equació 3.1.

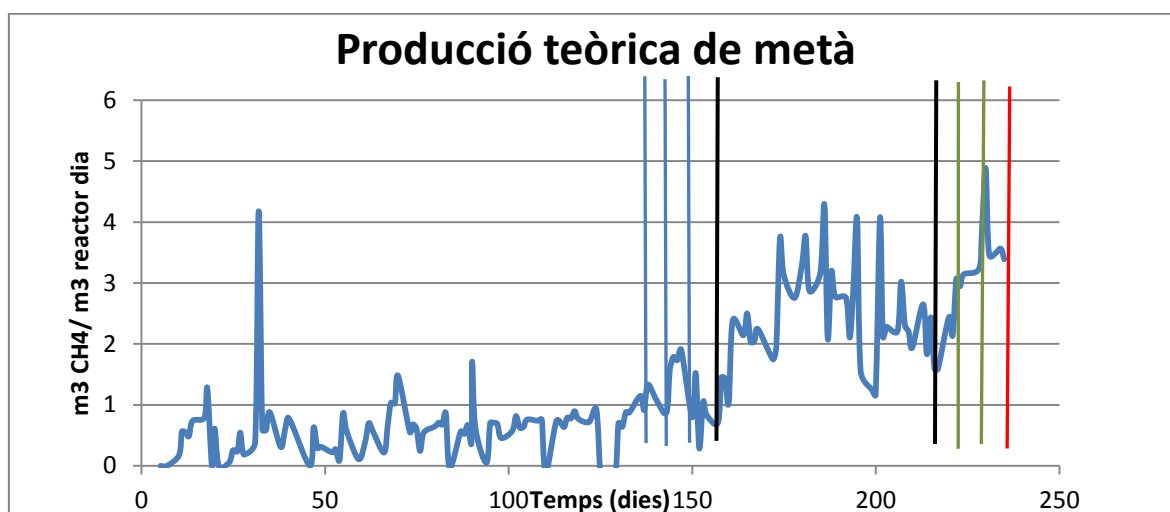


Figura 4.6 Producció teòrica de metàl·lic. Les línies blaves indiquen l'augment esglaonat de VCO (períodes 1.2, 1.3 i 1.4). Les línies verdes indiquen la substitució progressiva d'àcid acètic a metanol (períodes 2.1, 2.2 i 2.3). La línia vermella marca l'inici de l'alimentació exclusivament amb metanol. Les línies negres delimiten els períodes 1, 2 i 3.

La producció de metàl·lic es situà al voltant de 300 mL CH₄/dia durant tot el període 1.1, fins que es començà a augmentar la VCO, arribant a una producció de 1500 – 2000 mL CH₄/dia amb la VCO de 10 kg DQO/m³·dia a partir del període 1.4, una producció entre la que van obtenir Rintala *et al.* (1993), amb una DQO similar (3-4 g/L), i Brummeler *et al.* (1985) de 1280 mL CH₄/dia i 4560 mL CH₄/dia respectivament.

A la Taula 4.2 es presenta l'evolució de la producció teòrica de metàl·lic al llarg dels períodes d'operació.

Taula 4.2 Producció teòrica de metàl·lic en els diferents períodes

	mL CH ₄ /dia	m ³ CH ₄ /m ³ reactor·dia	L CH ₄ /g DQO·dia
Període 1	231	0,66	0,24
Període 2	1050	2,47	0,36
Període 3	1839	3,06	0,57

4.5 Evolució del pH de l'efluent

Durant tot el temps d'operació del reactor es va analitzar el pH de diverses mostres, tant d'influent com efluent, i s'observà que aquest es mantenia al voltant de 7,3. Això mostra que malgrat acumulacions puntuals d'àcid acètic, el sistema estava ben tamponat.

4.6 Assajos d'activitat

Per tal de determinar l'evolució en l'activitat dels grànuls durant l'operació del reactor UASB, es van realitzar diversos assajos d'activitat de l'inòcul inicial (Figura 4.7) i dels grànuls al final del període 2 (Figura 4.8), abans de la substitució d'àcid acètic per metanol. A la Figura 4.7 i 4.8 es pot veure l'evolució de la producció de metà per cada un dels assajos d'activitat.

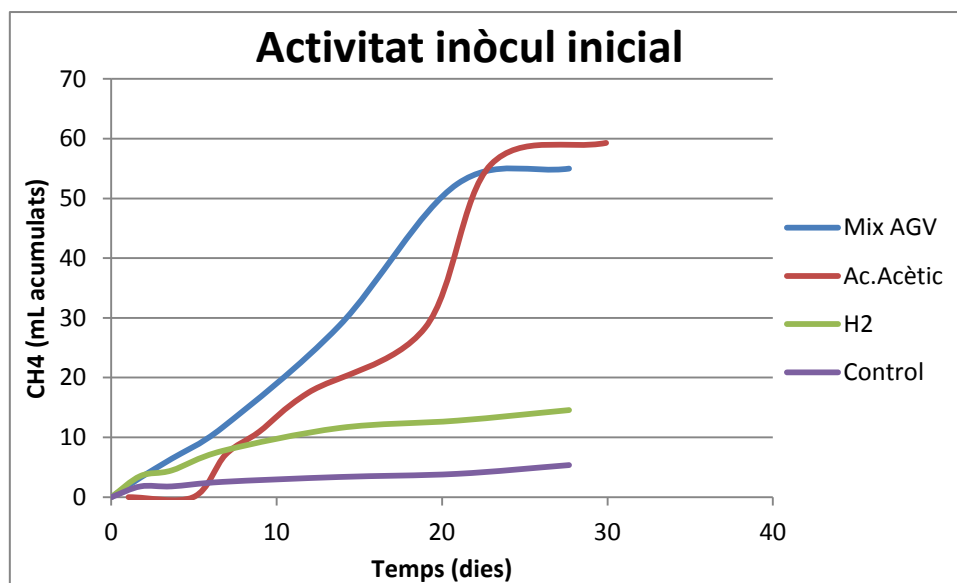


Figura 4.7 Assaig d'activitat metanogènica de l'inòcul inicial.

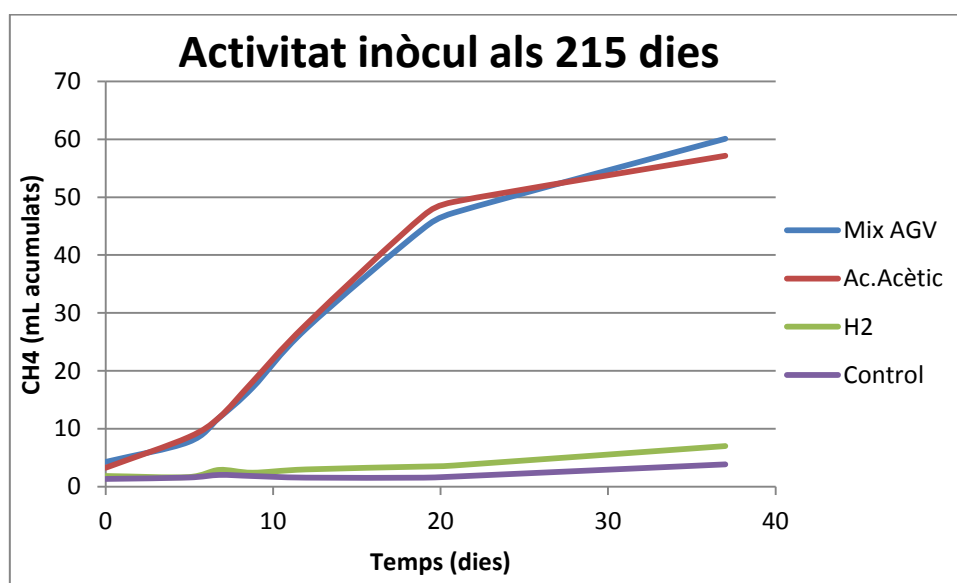


Figura 4.8 Assaig d'activitat metanogènica al final del segon període.

Tal com es pot observar, l'activitat dels grànuls en el moment inicial, malgrat haver-se conservat durant un llarg període de temps refrigerats a 3-5 °C, és elevada. Els grànuls, mostren una resposta similar a l'activitat amb àcid acètic i mix d'AGV, i en canvi una baixa activitat en front a l'H₂ (Figura 4.7).

Després de 215 dies d'operació del reactor alimentant amb àcid acètic, s'observa una certa activació dels grànuls. Comparant les dues figures s'aprecia que la fase de latència amb àcid acètic ha disminuït notablement i el pendent inicial és més constant que en l'inòcul inicial. Tot i això els valor de producció de CH₄ màxims van ser semblants, al voltant de 60 mL, encara que s'esperava una producció màxima de 80 mL.

Si comparem la fase de latència (Taula 4.3) i els pendents inicials (Taula 4.4), observem que la biomassa al temps 215 dies, té una fase de latència amb acètic i mix d'AGV de 1 dia, enfront de la fase de latència de l'inòcul inicial de 7 dies amb acètic i 2 dies amb mix d'AGV. El pendent inicial ha augmentat amb àcid acètic i s'ha mantingut amb Mix AGV, però amb hidrogen ha disminuït molt. Aquest decrement és comprensible ja que només s'ha estat alimentant amb àcid acètic i per tant no hi havia hidrogen disponible per ser consumit.

Taula 4.3 Comparativa del temps (dies) de les fases de latència de l'inòcul a temps inicial i a 215 dies.

Latència	Mix AGV	Àc.acètic	H2
Inòcul inicial	2	7	2
Inòcul 215 dies	1	1	7

Taula 4.4 Comparativa dels assajos d'activitat de l'inòcul a temps inicial i a 215 dies.

Assaig	Mix AGV (ml CH ₄ /gSS V·d)	Àc.acètic (ml CH ₄ /gSS V·d)	H ₂ (ml CH ₄ /gSS V·d)	Mix AGV (mgDQO/gSS V·d)	Àc.acètic (mgDQO/gSS V·d)	H ₂ (mgDQO/gSS V·d)
Inòcul inicial	50,67	57,64	8,00	144,76	164,68	22,86
Inòcul 215 dies	47,58	74,53	1,03	135,94	212,95	2,94

Aquests valors dels assajos amb àcid acetic són comparables, fins i tot superior, amb els de Palatsi *et al.* (2010), els quals obtingueren 130 mg DQO/gSSV·d. L'enriquiment del inòcul amb microrganismes metanogènics acetoclàstics ha estat positiu, com es comprova de l'increment de l'activitat acetoclàstica de 164,7 a 212,9 mg DQO/g SSV·d durant els 215 dies de l'assaig.

L'activitat aparent de l'inòcul en el reactor és superior a la dels assajos, 361,93 mg DQO/gSSV·d, però dins el mateix ordre de magnitud. Aquest canvi respecte els assajos pot correspondre a l'heterogenitat de l'inòcul que s'introdueix en els vials que pot retenir medi líquid.

Un cop acabat el període d'alimentació amb metanol es realitzarà un tercer assaig d'activitat per determinar si s'ha aconseguit l'enriquiment amb biomassa hidrogenotròfica.

5. Conclusions

En aquest estudi s'ha buscat enriquir quantitats significatives de biomassa granular hidrogenotròfica operant un reactor UASB adaptat a condicions d'altres velocitats de càrrega orgànica.

S'ha aconseguit activar una biomassa granular conservada en refrigeració durant un llarg període de temps. L'enriquiment de la biomassa granular s'ha realitzat incrementant progressivament la VCO fins a valors de 10 kg DQO/m³d. A mesura que s'ha augmentat la càrrega, el fang granular ha respost adequadament assolint valors molt elevats tant de degradació de la matèria orgànica (70-95%) com en la concentració de metà del biogàs produït (70-80%). Així mateix, quan s'ha substituït l'àcid acètic de l'influent per metanol com a única font de carboni, la biomassa granular ha reaccionat adequadament amb eliminacions de DQO superiors al 90% i unes concentracions de CH₄ del 83%. En els assajos d'activitat s'ha observat una bona resposta del fang amb àcid acètic, obtenint resultats elevats (212,95 mgDQO/gSSV·d) comparables amb valors de la bibliografia.

Tot i que el projecte no ha acabat i la caracterització microbiana no s'ha portat a terme encara, s'ha aconseguit adaptar la biomassa a unes condicions de velocitat de càrrega orgànica elevada i activar un inòcul granular. Per tant, considerant la bona resposta del fang granular, tot fa preveure que s'assolirà un enriquiment adequat de la biomassa per inocular al reactor bioelectroquímic que té com a objectiu obtenir CH₄ a partir de CO₂.

6. Referències bibliogràfiques

Affes, R. (2013): Study of methods for the improvement of the anaerobic digestion of lipids and long chain fatty acids. PhDdissertation. UPC – Doctoral Program on Environmental Engineering.

Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K. (1999). A Comprehensive Model of Anaerobic Bioconversion of Complex Substrates to Biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 3, 363-372.

Appels, L., Lauwers, J., Degreè, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Dewil, R. (2011). Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 9, 4295–4301.

Badshah, M., Parawira, W., Mattiasson, Bo., (2012). Anaerobic treatment of methanol condensate from pulp mill compared with anaerobic treatment of methanol using mesophilic UASB reactors. *Bioresource Technology* 125, 318-327.

Biogas barometer (2012). *SYSTÈMES SOLAIRES, le journal des energies renouvelables*. N° 212.

Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V, Pavlostathis, S. G., & Rozzi, A. (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1), 1, 1, 65–74.

Brummeler, E., L.W. Hulshoff, J. Dolfing, G. Lettinga and A.J.B. Zehnder, (1985). Methanogenesis in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at pH 6 on an acetate-propionate mixture, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 6, 1472-1477.

Cabanes J. (1989). Digestión anaerobia de lodos de depuradora. Etapas controlantes y cinética del proceso. Ph. D. Thesis, Universidad de Alicante, España.

Calderón, K., González-Martínez, A., Gómez-Silván, C., Osorio, F., Rodelas, B., González-López, J. (2013). Archaeal diversity in biofilm technologies applied to treat urban and industrial wastewater: recent advances and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 18572-18598.

Chong, S., Sen, T. K., Kayaalp, A., & Ang, H. M. (2012). The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment--a state-of-the-art review. *Water Research*, 46, 11, 3434–70.

Costa, K. C., & Leigh, J. a. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 29C, 70–75.

De Zeeuw, W.J., Lettinga, G., (1980). Use of anaerobic digestion for wastewater treatment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46, 1, 110-112.

- Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7, 2, 173–190..
- Demirel, B., & Yenigün, O. (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77, 7, 743–755.
- Ditzig, J.L., Liu, H., Logan, B.E., (2007). Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 2296–2304.
- Dolfing J. (1987). Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. Ph. D. Thesis, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.
- Driessen, W., Tielbaard, M., Yspeert, L.H.a.P., 2000. Anaerobic treatment of evaporator condensates from the chemical pulp industry. VI Latin American IWA Workshop and Seminar on Anaerobic Digestion, November 5–9, 2000, Recife, Brazil.
- Dubourgier HC, Prensier G, Albagnac G, (1987). Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge. In: Lettinga G, Zehnder AJB, Grotenhuis JTC, Hulshoff Pol LW, editors. Granular anaerobic sludge: microbiology and technology. The Netherlands: Pudoc Wageningen, 18–33.
- Escapa, A., San Martín, M. I., & Morán, A. (2014). Potential Use of Microbial Electrolysis Cells in Domestic Wastewater Treatment Plants for Energy Recovery. *Frontiers in Energy Research* 1–10.
- Fang ,H. P. and Chui, H. K. (1993). Maximum COD Loading Capacity in UASB Reactors at 38°C. *Journal of Environmental Engineering*, 199, 1, 103-119.
- Flotats, X., Sarquella, L. (2008). Producció de biogàs per codigestió anaeròbia. Col·lecció Quadern Pràctic, número 1. Institut Català d'Energia, Barcelona. ISBN B-29.655-2008, 55.
- Gehr, R and Henry, J.G, (1983). Removal of extracellular material techniques and pitfalls. *Water Research*, 17, 12, 1743-1748.
- Habeeb, S.A., Bin, Z, Latif, A.B., (2010). A Review on Properties of the Digestion Process in the Up-Flow Anaerobic Sludge Bed (UASB) Reactor, *Canadian Journal on Environmental, Construction and Civil Engineering*, 1, 3, 58–70.
- Hamelers, H. V. M., Ter Heijne, A., Sleutels, T. H. J. a, Jeremiasse, A. W., Strik, D. P. B. T. B., & Buisman, C. J. N. (2010). New applications and performance of bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1673–85.
- Hattori, S., (2008). Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes Environmental*, 23, 118-127.

- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y., (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1623-1630.
- Hulshoff Pol LW, De Zeeuw WJ, Velzeboer CTM, Lettinga G. (1983). Granulation in UASB reactors. *Water Science and Technology* 3, 15, 291–304.
- Kalyuznyi S.V. (1997). Batch anaerobic digestion of glucose and its mathematical modeling. II. Description, verification and application of model. *Bioresource Technology*, 59, 249-258.
- Kelleher, B. P. (2002). Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Bioresource Technology*, 83, 27–36.
- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., Kim, B.H., (2002). Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 145–152.
- Kleerebezem R., Macarie H. (2003). Treating industrial wastewater: Anaerobic digestion comes of age. *Chemical Engineering*, 110, 4, 56-64.
- Kwietniewska, E. & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 491–500.
- Lettinga, G., and L. W. Hulshoff Pol (1991) "UASB-Process Designs for Various Types of Wastewaters," *Water Science and Technology*, 24, 8, 87-107.
- Lettinga, G., Van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., Klapwijk, A (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment, *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1980, 699-734.
- Logan, B.E. , Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V.M. , Sleutels, T.H.J.A. , Jeremiasse, A.W. , Rozendal, R., (2008). Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environmental Science and Technology*, 42, 8630–8640.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W. , Rabaey, K., (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science and Technology*, 40, 5181–5192.
- Metcalf & Eddy. *Wastewater engineering, treatment and reuse*. 4 ed. McGraw-Hill, United States of America, 2004.
- Min, B., & Angelidaki, I. (2008). Innovative microbial fuel cell for electricity production from anaerobic reactors. *Journal of Power Sources*, 180, 1, 641–647.

- Min, B. and Logan, B.E, 2004. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, 38, 21, 5809-5814.
- Mosey, F.E. (1983). Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanism for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science and Technology*, 25, 209-232.
- Latif, M. A., Ghufuran, R., Wahid, Z. A., & Ahmad, A. (2011). Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters. *Water Research*, 45, 16, 4683–99.
- Palatsi, J., Illa, J., Prenafeta, F. X., Laureni, M., Fernandez, B., Angelidaki, I., Flotats, X. (2010). Long-chain fatty acids inhibition and adaptation process in anaerobic thermophilic digestion: Batch tests, microbial community structure and mathematical modelling. *Bioresource Technology*, 101, 2243-2251.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gómez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21, 5-6, 411-490.
- Pereboom JHF. (1994). Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors. *Water Science and Technology*, 30 ,12, 211–21.
- Potter, M. C. (1910) "On the Difference of Potential due to the Vital Activity of Microorganisms," *Durham University Philosophical Sociey*, 3, 245-9.
- Powar, M. M., Kore, V. S., Kore, S. V, & Kulkarni, G. S. (2013). Review on applications of UASB technology for wastewater treatment. *International Journal of Advanced Science, Engineering and Technology*, 2, 2, 125–133.
- Rabaey, K., Verstraete, W., (2009). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23, 291–298.
- Rintala J., Lepistö S., Ahring B., (1993). Acetate Degradation at 70 °C in Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors and Temperature Response of Granules Grown at 70 °C. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 6, 1742-6.
- Rozendal, R. a, Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J., & Buisman, C. J. N. (2008). Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 26, 8, 450–9.
- Sam-Soon PALNS, Loewenthal RE, Dold PL, Marais GvR, (1987). Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor. *Water SA*, 13, 2, 69–80.
- Schmidt JE, Ahring BK, (1996). Review: Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioengineering*, 49, 229–46.

- Seghezzo, L., Gutiérrez, M. A., Trupiano, A. P., Figueroa, M. E., & Carlos, M. (1998). The effect of sludge discharges and upflow velocity on the removal of suspended solids in a UASB reactor treating settled sewage at moderate temperatures. *Bioresource Technology*, 65, 367–372.
- Singh, R. P., Kumar, S. and Ojha, C. S. P., (1999). Nutrient requirement for UASB process: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 35-54.
- Tilche, A., Galatola, M., (2008). The potential of bio-methane as bio-fuel/bio-energy for reducing greenhouse gas emissions: a qualitative assessment for Europe in a life cycle perspective. *Water Science and Technology*, 57 ,11, 1683 –1692.
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Annie Modestra, J., & Srikanth, S. (2014). Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 779–797.
- M. Villano, F. Aulenta, C. Ciucci, T. Ferri, A. Giuliano, M. Majone, (2010). Bioelectrochemical reduction of CO₂ to CH₄ via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture *Bioresource Technology*, 101, 3085–3090.
- Villano, M., Aulenta, F., & Majone, M. (2012). Perspectives of biofuels production from renewable resources with bioelectrochemical systems, *Asian-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7, 3, 263-274.
- Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 849–860.
- Wiegant, W. M. & De Man, A. W. A. (1986). Granulation of biomass in thermophilic anaerobic sludge blanket reactors treating acidified wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 718-27.
- Weld, R. J., & Singh, R. (2011). Functional stability of a hybrid anaerobic digester/microbial fuel cell system treating municipal wastewater. *Bioresource Technology*, 102, 2, 842–7.
- Ziemiński, K., & Frąc, M. (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11, 18, 4127–4139.
- Zhang, B., Zhao, H., Zhou, S., Shi, C., Wang, C., & Ni, J. (2009). A novel UASB-MFC-BAF integrated system for high strength molasses wastewater treatment and bioelectricity generation. *Bioresource Technology*, 100, 23, 5687–93.
- Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2014). Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: recent advances and future challenges. *Water Research*, 56, 11–25.
- Zinder S. H. and Koch M. (1984) Non-aceticlastic Methanogenesis from Acetate: Acetate Oxidation by a Thermophilic Syntrophic Coculture. *Archives of Microbiology*, 138, 263-272.